

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Identificação e análise de conservação de RNAs circulares presentes no  
gênero *Oryza***

Débora Camargo Zamban

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Março de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Identificação e análise de conservação de RNAs circulares presentes no  
gênero *Oryza***

Débora Camargo Zamban

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Professor Dr. Rogerio Margis

Co-orientadora: Professora Dra. Franceli Rodrigues Kulcheski

Porto Alegre, Março de 2019

## **BANCA EXAMINADORA**

Professora Dra. Carmem Juracy Silveira Gottfried

Programa de Pós-graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Professor Dr. Felipe Klein Ricachenevsky

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-graduação em Agrobiologia

Universidade Federal de Santa Maria

Professor Dr. Charley Christian Staats

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas, vinculado ao Departamento de Biofísica e ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o Ministério da Ciência e Tecnologia através de um projeto INCT e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) financiaram os estudos realizados.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado até aqui, mesmo que por caminhos e de formas que eu não compreendo totalmente;

Aos meus pais, Paulo Renato e Rosilaine e aos meus avós, Calvino e Ezaira, Jango e Maria (*in memoriam*) pelo apoio dispensado e, simplesmente, por existirem;

Aos colegas de laboratório por tantas ajudas prestadas ao longo desses dois anos;

Ao professor Rogerio Margis, pela disponibilização do laboratório e de todos os recursos necessários para a execução deste trabalho, bem como pela sua abertura em receber ideias e discutilas;

À professora Márcia Margis, pela sua disponibilidade em acompanhar uma parte deste trabalho e pela disponibilização do seu laboratório e de recursos para pesquisa;

Aos demais professores, funcionários, e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial à Silvia Centeno, pela solicitude e simpatia de sempre;

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite para avaliar esta dissertação, e à Fernanda Cortez Lopes, por ter sido a revisora interna;

Enfim, agradeço a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 RNAs circulares.....	14
1.2 RNAs circulares nos domínios da vida.....	16
1.3 Biogênese de RNAs circulares.....	16
1.4 Funções de RNAs circulares.....	20
1.5 O gênero <i>Oryza</i> .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Identificação <i>in silico</i> de RNAs circulares.....	26
4.2 Validação dos RNAs circulares identificados <i>in silico</i> .....	27
4.2.1 Identificação de sítios de ligação de microRNAs nos circRNAs.....	27
4.2.2 Material vegetal.....	28
4.2.3 Desenho de oligonucleotídeos divergentes para detecção de circRNAs.....	28
4.2.4 Extração do RNA total.....	30
4.2.5 Síntese do DNA complementar.....	30
4.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR, de <i>polymerase chain reaction</i> ).....	31
4.2.7 Purificação dos produtos de PCR.....	31

4.2.8 Sequenciamento de Sanger .....	31
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 Identificação <i>in silico</i> de RNAs circulares.....	32
5.2 Caracterização dos RNAs circulares.....	32
5.3 Validação dos RNAs circulares por PCR e sequenciamento em arroz <i>ssp. japonica</i> cv. Nipponbare.....	35
5.4 Análise da conservação de RNAs circulares no gênero <i>Oryza</i> .....	39
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>
<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGO – Argonauta;

BSJ – junção de *backsplicing* (do inglês, *backsplicing junction*);

circRNA – RNA circular;

cv. – cultivar;

EMBL – Laboratório Europeu de Biologia Molecular (do inglês, *European Molecular Biology Laboratory*);

ENA – Arquivo Europeu de Nucleotídeos (do inglês, *European Nucleotide Archive*);

ha – hectare;

HTS – sequenciamento de alta performance (do inglês, *high throughput sequence*);

lncRNA – RNA longo não codificante (do inglês, *long noncoding RNA*);

miR-7 – microRNA 7;

MRE – elemento de resposta a microRNA (do inglês, *microRNA response element*);

mRNA – RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*);

ncRNA – RNA não codificante (do inglês, *noncoding RNA*);

Os – *Oryza sativa*;

pb – par (es) de bases (do inglês, *base pairs*);

PcF – *primer* circular direto (do inglês, *primer circular forward*);

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*);

Pol II – Polimerase II;

pré-mRNA – RNA mensageiro primário;

pré-RNA – RNA primário;

PuR – *primer* universal reverso (do inglês, *primer universal reverse*);

RNA – ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*);

RNA-Seq – sequenciamento de RNA (do inglês, *RNA Sequencing*);

rpm – rotações por minuto;

rRNA – RNA ribossomal (do inglês, *ribosomal RNA*);

snRNP – ribonucleoproteína nuclear pequena (do inglês, *small nuclear ribonucleoprotein*);

ssp. – subespécie;

ssRNA-Seq – sequenciamento de RNA de fita específica (do inglês, *specific strand RNA sequencing*);

TER – taxa de alongamento da transcrição (do inglês, *transcription elongation rate*);

UTR – região não traduzida (do inglês, *untranslated region*).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem de circRNAs a partir de diferentes regiões do genoma.....	17
Figura 2. Dois possíveis mecanismos para a geração de circRNAs.....	18
Figura 3. <i>Workflow</i> do <i>software</i> CirComPara.....	27
Figura 4. Representação da posição de <i>primers</i> divergentes em sequências lineares e circulares.....	29
Figura 5. Gel de agarose para os circRNAs que apresentaram um único produto de PCR em amostras de folha de arroz.....	36
Figura 6. Gel de agarose para os circRNAs com múltiplos amplicons em amostras de folha de arroz.....	36
Figura 7. Gel de agarose para os circRNAs que apresentaram amplificação em raízes de arroz.....	37
Figura 8. Representação do gene parental e do circRNA_Os03g12064, evento de <i>backsplicing</i> e perfil de eletroferograma obtido por sequenciamento de Sanger deste circRNA em amostras de folha jovem de arroz.....	38
Figura 9. Perfis dos eletroferogramas obtidos por sequenciamento de Sanger dos circRNAs amplificados por PCR em amostras de folhas jovens de arroz.....	39
Figura 10. Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação por PCR dos circRNAs que apresentaram amplificação em amostras de folha de diferentes espécies de <i>Oryza</i> .....	40
Figura 11. Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação por PCR dos circRNAs que apresentaram amplificação em amostras de raiz de diferentes espécies de <i>Oryza</i> .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bibliotecas utilizadas na identificação <i>in silico</i> de circRNAs e seus códigos de acesso ao ENA.....	26
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de circRNAs e tamanho do produto de PCR esperado.....	29
Tabela 3. circRNAs identificados em <i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>japonica</i> cv. Nipponbare pelo CirComPara.....	32
Tabela 4. circRNAs identificados pelo CirComPara por ao menos 3 métodos e em, ao menos 3 bibliotecas.....	33
Tabela 5. microRNAs com sítios de ligação nos circRNAs.....	33
Tabela 6. Dados de caracterização dos circRNAs confirmados em <i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>japonica</i> cv. Nipponbare.....	35

## RESUMO

Os RNAs circulares (circRNAs) constituem uma interessante classe de moléculas dentro do diverso mundo dos RNAs. Uma ligação fosfodiéster unindo uma extremidade 3' doadora de *splicing* à uma extremidade 5' aceptora de *splicing* confere à molécula circular alta estabilidade, devido à ausência de extremidades livres passíveis de degradação por exonucleases. Esses transcritos foram inicialmente descobertos em viróides de plantas e posteriormente em eucariotos, mas receberam pouca atenção até o advento de tecnologias de sequenciamento de nova geração, que permitiram identificá-los em diversos grupos de organismos nos domínios da vida. Estudos têm mostrado que tais moléculas participam da regulação gênica nos níveis transcricional e pós-transcricional, estão associados a processos patológicos em mamíferos e são responsivos a diferentes tipos de estresses em plantas. Neste trabalho, foi realizada a identificação *in silico* de circRNAs em *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare, que resultou na detecção de mais de 89 mil eventos preditos de *backsplicing*. Desse total, foram selecionados para validação doze circRNAs que satisfizeram critérios específicos, como terem sido detectados por pelo menos três métodos de bioinformática e possuírem sítios de ligação para microRNAs. Entre esses, nove sequências foram confirmadas em amostras de folhas em diferentes estágios, através de RT-PCR com o uso de *primers* divergentes e dessas, sete foram confirmadas por ressequenciamento. A maioria dos circRNAs testados, exibiram múltiplos produtos de PCR, indicando a ocorrência de circularização alternativa do transcrito primário, processo já observado em outros trabalhos. A conservação dos transcritos circulares confirmados por ressequenciamento foi em seguida testada em diferentes tecidos de outras seis espécies do gênero *Oryza*. As espécies *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon* e *O. punctata* apresentaram amplificação de pelo menos um circRNA nas amostras de folha testadas. Nas amostras de raiz, as espécies *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon*, *O. punctata* e *O. australiensis* também apresentaram amplificação para pelo menos um dos circRNAs testados. Os genes parentais dos circRNAs identificados inicialmente em *O. sativa* possuem homólogos nas demais espécies avaliadas, porém, alguns circRNAs exibiram produtos de PCR com tamanhos diferentes dos esperados para *O. sativa*, sendo que devem ser ressequenciados para confirmação de que são oriundos dos circRNAs testados. A possibilidade de encontrar circRNAs conservados entre diferentes espécies do gênero *Oryza* oferece um novo nível molecular para estudo de características genéticas potencialmente úteis do ponto de vista agrônômico, além de contribuir para a compreensão dos processos evolutivos dessa classe de RNA.

## ABSTRACT

Circular RNAs (circRNAs) constitute an interesting class of molecules within the diverse world of RNAs. A phosphodiester linkage attaching a splicing donor 3' end to a 5' splicing acceptor end gives the circular molecule high stability, due to the absence of free ends susceptible to exonuclease attack. These transcripts were initially discovered in plant viroids and later in eukaryotes, but received little attention until the advent of next generation sequencing technologies, which allowed them to be identified in several groups of organisms in the domains of life. Studies have shown that such molecules participate in gene regulation at the transcriptional and post-transcriptional levels, are associated with pathological processes in mammals and are responsive to different types of plant stress. In this work, the *in silico* identification of circRNAs in *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare, which resulted in the detection of more than 89,000 predicted backsplicing events. From this total, twelve circRNAs satisfying specific criteria were selected for validation, such as having been detected *in silico* by at least three methods and having binding sites for microRNAs. Among these, nine sequences were confirmed in leaf samples at different stages, through PCR with the use of divergent primers and of these, seven were confirmed by resequencing. Most of the circRNAs tested showed multiple PCR products, indicating the occurrence of alternative circularization of the primary transcript, a process already observed in other works. The conservation of circular transcripts confirmed by re-sequencing was then tested in different tissues of six other species of the genus *Oryza*. The species *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon* and *O. punctata* showed amplification of a circRNA in the leaf samples tested. In the root samples, the species *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon*, *O. punctata* and *O. australiensis* also showed amplification for at least one of the circRNAs tested. The parental genes of the circRNAs identified initially in *O. sativa* have homologues in the other species tested, indicating that the amplicons observed in these species are from circRNAs, but some circRNAs exhibited PCR products with sizes different from those expected in *O. sativa* which must be re-sequenced to have their nature confirmed. The possibility of finding conserved circRNAs among different species of the genus *Oryza* offers a new potential at molecular level for the study of agronomic useful genetic characteristics, besides to contribute to the understanding of the evolutionary processes of this class of RNA.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 RNAs circulares

RNAs circulares (circRNAs) são moléculas de RNA de fita simples, que não possuem CAP nem cauda poli (A), e estão com as extremidades 5' e 3' de seus transcritos iniciais covalentemente unidas entre si por uma ligação fosfodiéster (SANGER et al., 1976; SALZMAN et al., 2012).

Em 1976, Sanger e colaboradores descreveram, pela primeira vez, moléculas de RNA na forma circular. Ao estudarem viróides de plantas, os pesquisadores observaram, por microscopia eletrônica, que quando tais moléculas foram submetidas à desnaturação por calor, passaram de uma forma de haste para uma forma circular. Em seguida, testes de fosforilação enzimática da extremidade 5' e de oxirredução da extremidade 3' falharam, indicando que ambas as extremidades não estavam livres, mas covalentemente ligadas, confirmando, assim, a estrutura circular dos viróides (SANGER et al., 1976).

Em eucariotos, os primeiros relatos da existência de circRNAs foram no ciliado *Tetrahymena thermophila*, onde um íntron do gene codificante do rRNA é excisado durante o *splicing* do pré-RNA ribossomal e, em seguida, convertido à uma forma variante circular (GRABOWSKI et al., 1981). Ainda na década de 1980, circRNAs foram encontrados em archaea, também derivados de um íntron removido do pré-23S RNA (KJEMS et al., 1988).

Em eucariotos superiores, as primeiras evidências da existência de circRNAs surgiram na década de 1990, quando pesquisadores buscavam caracterizar um possível gene humano supressor de tumor, *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*), que além de gerar transcritos com éxons na mesma ordem presente no gene, gerava um tipo de transcrito não poliadenilado, no qual os éxons se arranjavam numa sequência invertida: o sítio 3' do éxon 4 se ligava ao sítio 5' do éxon 3, por exemplo. Tais éxons foram denominados de *scrambled*, por estarem numa ordem desordenada, e os transcritos com esse arranjo representavam cerca de 0,1% dos transcritos com os éxons na mesma ordem gênica, o que levou os pesquisadores a suporem que eram resultantes de erros de *splicing* (NIGRO et al., 1991).

Cocquerelle et al. (1992), ao estudarem o gene humano *ETS-1*, também detectaram transcritos com éxons fora de ordem, que apresentavam um nível de expressão de 1% em relação aos seus cognatos lineares. Mais tarde, tais transcritos foram identificados como circRNAs e classificados como produtos de *mis-splicing* (COCQUERELLE et al., 1993).

Contrapondo a hipótese de que os circRNAs eram apenas produtos de falhas ocorridas durante o processamento do pré-mRNA, Capel et al. (1993) demonstraram que um transcrito circular derivado do gene *Sry*, o qual determina o sexo em mamíferos machos, representava mais de 90% dos transcritos do gene em testículos de ratos adultos, enquanto que a forma canônica linear era majoritariamente expressa por células somáticas da crista genital durante o desenvolvimento embrionário. Análises da

sequência de nucleotídeos do transcrito circular revelaram a presença de uma fase aberta de leitura e códons de iniciação da tradução, porém, os circRNAs não estavam associados a polissomos e sua função não foi determinada. Ainda assim, o trabalho de Capel et al. (1993) mostrou, pela primeira vez, que um circRNA podia ser predominantemente expresso e que sua expressão (ao menos neste caso) se dava de forma tecidual e estágio de desenvolvimento específica.

Nos anos subsequentes, outros trabalhos reportando a existência de circRNAs foram publicados, como o de Burd et al. (2010), o qual demonstrou que a expressão de isoformas circulares do RNA longo não codificante ANRIL (*Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus*) pode estar correlacionada à suscetibilidade à aterosclerose vascular em mamíferos, sendo esta a primeira evidência da associação de um fenótipo com a expressão de circRNAs.

Apesar dos trabalhos publicados até então, pouca atenção tinha sido atribuída aos RNAs circulares até o início desta década, tanto por serem expressos em baixos níveis, quanto por não terem funções claramente evidenciadas. Esse cenário mudou quando o *high-throughput sequence* (HTS) passou a ser empregado no estudo de transcritomas, o que além de fornecer o perfil transcricional de amostras biológicas numa dada condição, permitiu a identificação e descoberta de transcritos pouco explorados ou desconhecidos, incluindo *small and long noncoding RNAs*, e formas alternativas de *splicing*.

Usando o processo de sequenciamento em ampla escala (*deep sequencing*) para estudar transcritos variantes em células humanas leucêmicas, Salzman et al. (2012) encontraram centenas de transcritos que apresentavam éxons em uma ordem embaralhada (*scrambled*). Inicialmente, os autores supunham que tais transcritos eram originários de oncogenes que sofreram rearranjos. Porém, a análise de transcritomas de células não tumorais também revelou a presença de inúmeros transcritos com éxons em ordens não lineares. Tais transcritos foram confirmados como circRNAs e os níveis de expressão de alguns deles eram muito semelhantes aos níveis de suas formas canônicas lineares. Este trabalho foi o primeiro a utilizar HTS na identificação de circRNAs e forneceu evidências que tais moléculas não eram resultantes de rearranjos intragênicos, mas que eram produzidas por algum processo diferencial de *splicing* presente em muitos tipos celulares.

Além disso, o estudo de Salzman et al. (2012) forneceu uma nova perspectiva sobre os circRNAs e muitas pesquisas passaram a ser realizadas desde então, a fim de responder as muitas questões sobre a natureza dessas moléculas, como por exemplo: se são expressas em todos os domínios da vida; qual seu mecanismo de biogênese; quais funções exercem; etc.

## 1.2 RNAs circulares nos domínios da vida

RNAs circulares têm sido identificados em diversas espécies entre os domínios da vida Eukarya e Archaea. Em eucariotos, como citado anteriormente, a primeira espécie em que circRNAs foram detectados foi *Tetrahymena thermophila* (GRABOWSKI et al., 1981), seguido de esporádicos registros nos anos seguintes em humanos (NIGRO et al., 1991; COCQUERELLE et al., 1992; CAPEL et al., 1993; ZAPHIROPOULOS, 1997), camundongos (ZAPHIROPOULOS, 1996; CHAO et al., 1998), e em *Drosophila melanogaster* (HOUSELEY et al., 2006), todavia, cada um desses trabalhos identificou circRNAs derivados de somente um ou poucos genes que estavam sendo estudados de maneira específica.

Com o uso de HTS, circRNAs derivados de centenas de genes nas espécies já relatadas e em outras foram detectados, como no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (MEMCZAK et al., 2013), em porco (VENO et al., 2015; LIANG et al., 2017), em *zebrafish* (SHEN et al., 2016), na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, no protozoário *Plasmodium falciparum*, na ameba *Dictyostelium discoideum*, e em *Arabidopsis thaliana* (WANG et al., 2014).

Em humanos, mais de 183.000 circRNAs obtidos a partir do sequenciamento de RNA de diferentes tipos celulares estão depositados no banco de dados CIRCPedia v2 (<http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia/>). Acesso em 30\11\2019) (DONG et al., 2018).

Em plantas, circRNAs foram detectados em treze espécies até o momento, incluindo *Camelia sinensis*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Oryza sativa* L., além da já citada *A. thaliana*, totalizando mais de 98.000 circRNAs identificados (<http://ibi.zju.edu.cn/plantcircbase/>). Acesso em 30\01\2019) (CHU et al., 2018).

No domínio Archaea, DANAN et al. (2012) realizaram a identificação de circRNAs em *Sulfolobus solfataricus* e, em seguida, testaram um conjunto de 20 circRNAs confirmados nesta espécie por RT-PCR quanto a sua conservação em *Sulfolobus acidocaldarius*, dos quais 10 deles (50 %) foram confirmados.

## 1.3 Biogênese de RNAs circulares

Entre os grupos onde circRNAs têm sido identificados, é em metazoários que os estudos relativos à sua biogênese têm avançado mais significativamente. Os dados de RNA-Seq utilizados para estudo de circRNAs, e mesmo estudos anteriores a essa tecnologia, mostram que esses transcritos podem ser originados a partir de éxons (EcircRNA), íntrons (IcircRNA), éxons e íntrons (EIcircRNA), 5' UTR (de *Untranslated Region*), 3' UTR, 3'5' UTRs, regiões intergênicas, e mesmo de uma

combinação entre essas áreas do genoma nuclear (MENCZAK et al., 2013; GUO et al., 2014; LU et al., 2015; LIANG et al., 2017; PAN et al., 2018) e organelar (PAN et al., 2018) (Figura 1).

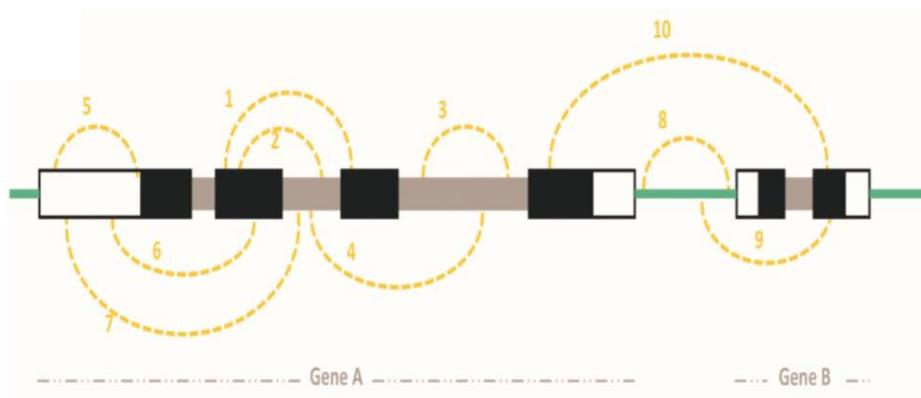


Figura 1. Origem de circRNAs a partir de diferentes regiões do genoma: 1) EcircRNA (circRNA exônico); 2) ElcircRNA (circRNA originado por éxon e íntron); 3) IcircRNA (circRNA originado de um único íntron); 4) IEcircRNA (circRNA originado de dois íntrons); 5) UcircRNA (circRNA originado de UTR); 6) UEcircRNA (circRNA originado de UTR e éxon); 7) UIcircRNA (circRNA originado de UTR e íntron); 8) IGcircRNA (circRNA originado de região intergênica); 9) IGGcircRNA (circRNA originado de região intergênica e éxon); 10) AGcircRNA (circRNA originado a partir de éxons de genes diferentes). As barras brancas representam as UTRs, e as barras pretas e cinzas representam os éxons e os íntrons, respectivamente. A linha verde representa regiões intergênicas e a linha amarela representa os circRNAs (adaptado de CHU et al., 2018).

Em plantas, a grande maioria dos circRNAs já identificados são provenientes de sequências codificantes, ou seja, circRNAs exônicos, com exceções como em *Triticum aestivum*, onde 63% dos circRNAs preditos são oriundos de regiões intergênicas. Em *Oryza sativa* L., predominam circRNAs exônicos (37,3 %), seguidos dos intrônicos (25,5 %) (PlantcircBase - <http://ibi.zju.edu.cn/plantcircbase/statistics.php?con=osa>. Acesso em 12\03\2019).

Os circRNAs são transcritos pela RNA Polimerase II (RNA Pol II) na forma de transcritos primários (pré-mRNA ou lncRNA), que através de um *splicing* diferencial sofrem um processo de circularização. Cocquerelle et al. (1993) descreveram o mecanismo de formação dos circRNAs originados do gene *ETS-1* e classificaram-no como um erro de *splicing*. Atualmente, esse mecanismo é amplamente aceito como um dos responsáveis pela circularização de transcritos, principalmente daqueles que contém éxons, e tem sido chamado de *backsplicing* (JECK et al., 2014).

No *backsplicing*, dois íntrons de um transcrito primário pareiam entre si, aproximando um sítio doador de *splicing* a um sítio aceptor de *splicing*. O sítio 5' aceptor de *splicing* de um íntron ataca o sítio 3' doador de *splicing* do outro íntron. Após, o sítio 3' doador de *splicing* que foi atacado, por sua vez ataca o sítio 5' aceptor de *splicing*. Então, as sequências dos dois íntrons se unem e ocorre a ligação

entre uma extremidade 3' de um éxon *downstream* com a extremidade 5' de um éxon *upstream*, dando origem ao circRNA (JECK et al., 2014) (Figura 2 A).

Outro mecanismo que pode provocar a circularização de RNAs é chamado de éxon *skipping* ou éxon pulado, que ocorre quando segmentos de RNA contendo um ou mais éxons flanqueados por íntrons são excisados do pré-mRNA durante o *splicing* alternativo, assumindo uma estrutura *lariat*, que, em seguida, tem os íntrons removidos e os éxons circularizados (Figura 2 B) (ZAPHIROPOULOS, 1996; JECK et al., 2014; KELLY et al., 2015; BARRET et al., 2015; CONN et al., 2017). Esse processo foi descrito durante a caracterização de circRNAs derivados de transcritos do gene P450 2C24 de células renais e hepáticas de ratos, que eram formados exatamente pelos éxons que estavam ausentes em um mRNA alternativo deste gene (ZAPHIROPOULOS, 1996).

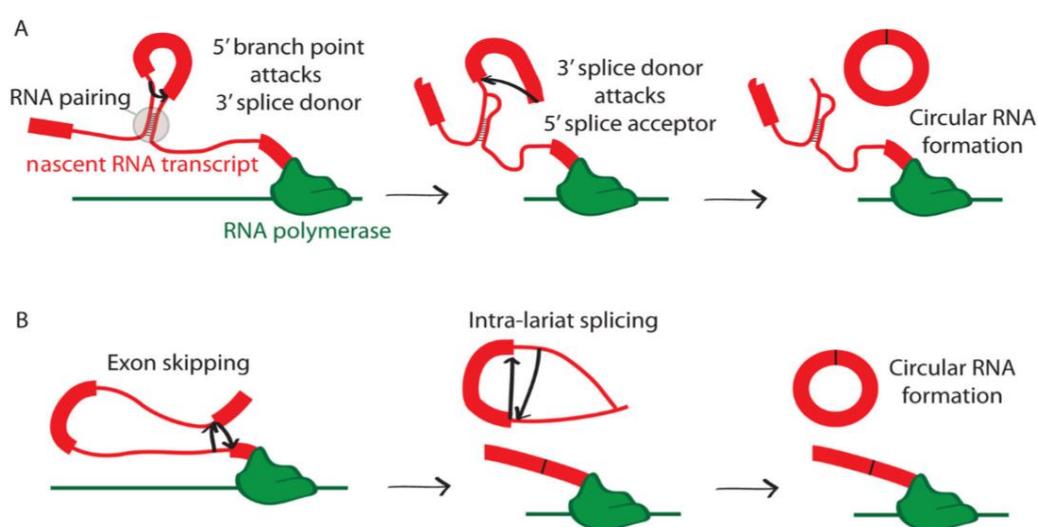


Figura 2. Dois possíveis mecanismos para a geração de circRNAs. **A** Evento de *backsplicing* dando origem ao um circRNA exônico. **B** circRNA exônico originado após evento de éxon *skipping* e processamento de forma *lariat* resultante (adaptado de JECK et al., 2014).

Há evidências de que o *backsplicing* pode ocorrer simultaneamente à transcrição, uma vez que centenas de *reads* de junções de *backsplicing* foram identificadas por RNA-Seq em amostras de RNA nascente isoladas de cabeça de *D. melanogaster* e fígado de camundongo (ASHWALL-FLUSS et al., 2014). No entanto, apesar do *backsplicing* poder ocorrer cotranscricionalmente, assim como o *splicing*, outros dados mostram que a maioria dos circRNAs são gerados após seus genes parentais terem sido completamente transcritos. Zhang et al. (2016) constataram que uma pequena parcela (menos de 10%) de circRNAs foram gerados após 60 min do início da transcrição, ponto em que 90 % dos genes parentais dos circRNAs identificados ao longo do estudo tinham sido totalmente transcritos. Nos intervalos de tempo avaliados em seguida, 2 h, 4 h e 16 h após o início da transcrição, o número de circRNAs aumentou expressivamente, indicando que o *backsplicing* ocorre predominantemente após a transcrição.

A maquinaria do spliceossomo participa da biossíntese de circRNAs, como demonstrado por Ashwall-Fluss et al. (2014), que ao mutarem de GU para CA os sítios 5' de *splicing* que flanqueiam éxons formadores de circRNAs em minigenes sintéticos, observaram que houve uma drástica redução na geração dos circRNAs. Em seguida, a inserção de éxons flanqueadores com fortes sítios 5' e 3' de *splicing* no minigene Luna, o qual produz altos níveis de circRNAs em *D. melanogaster*, causou acentuado decréscimo na circularização do minigene. Estas duas evidências sugerem a presença do spliceossomo ou ao menos da snRNP U1 (responsável pelo reconhecimento dos nucleotídeos do sítio 5' de *splicing*) no processo de circularização do transcrito primário, assim como apontam uma competição entre a biossíntese de circRNAs e o *splicing* canônico.

A competição entre esses processos foi também evidenciada quando os autores utilizaram *D. melanogaster* expressando uma RNA polimerase II com a subunidade maior mutada, que causa diminuição na taxa de alongamento do transcrito e favorece a ocorrência simultânea do *splicing* canônico. Os níveis de circRNAs diminuíram consideravelmente nas amostras de RNA-Seq das moscas mutadas em relação às amostras das moscas do tipo selvagem. Esta correlação entre a taxa de alongamento da transcrição (TER, de *Transcription Elongation Rate*) e a formação de circRNAs foi também observada por Zhang et al. (2016), quando testaram duas linhagens celulares contendo ou uma RNA Pol II com TER acelerada ou uma RNA Pol II com TER desacelerada, e viram que o nível de circRNAs nascentes era muito maior nas amostras com TER acelerada, enquanto que um baixo nível de circRNAs foi detectado nas amostras com TER reduzida, apontando que a formação de circRNAs é favorecida por uma rápida taxa de alongamento da transcrição.

Em animais, a composição dos íntrons flanqueadores de éxons que sofrem circularização parecem ser fundamentais para a ocorrência do *backsplicing*, tanto em relação ao seu tamanho, quanto à presença de *cis*-elementos, como repetições invertidas do elemento ALU (em humanos) (JECK et al., 2013; ASHWALL-FLUSS et al., 2014; ZHANG et al., 2014b). Já em plantas, *cis*-elementos regulatórios não foram observados até o momento (DOU et al., 2017).

Proteínas de ligação ao RNA (RBPs, de *RNA Binding Proteins*), como Quaking I e Muscleblind podem participar como *trans*-fatores no processo de biossíntese de alguns circRNAs, através de sua ligação a íntrons flanqueadores, aproximando essas sequências e favorecendo a circularização (CONN et al., 2015; ASHWALL-FLUSS et al., 2014). Além disso, muitos circRNAs apresentam um padrão de expressão celular e estágio de desenvolvimento específico, tanto em animais quanto em vegetais (MENCZAK et al., 2013; TONG et al., 2018).

## 1.4 Funções de RNAs circulares

Entre 1976, ano em que circRNAs foram descritos pela primeira vez (SANGER et al., 1976), até o começo desta década, relativamente poucos trabalhos sobre circRNAs foram publicados e, embora algumas evidências os relacionassem a processos patológicos em mamíferos (BURD et al., 2010;), suas funções eram totalmente desconhecidas.

Em 2013, Memczak e colaboradores realizaram a identificação de circRNAs em amostras de RNA-Seq de células humanas, de camundongos, e de células de *C. elegans* em diferentes estágios de desenvolvimento e observaram que muitos circRNAs continham elementos de resposta a microRNA (MRE, de *microRNA Response Elements*), ou seja, sequências complementares a microRNAs.

Em especial, o circRNA humano CDR1as (de *Cerebellar Degeneration-related Protein 1 antisense*) chamou a atenção por apresentar 74 sítios de ligação para o microRNA 7 (miR-7), conservado em mais de 30 espécies de vertebrados. A potencial interação entre essas duas classes de RNA foi comprovada por experimentos funcionais, que mostraram a ligação do circRNA CDR1as com a proteína Argonauta (AGO), a localização citoplasmática do circCDR1as, a coexpressão de miR-7 e circCDR1as em tecidos cerebrais de camundongo, além de mostrarem que alguns mRNAs alvos de miR-7 sofreram regulação negativa pelo *knock down* do circCDR1as em células HEK293, e que a ligação do miR-7 não causava a clivagem do circRNA (MEMKZAC et al., 2013). Juntas, tais evidências revelaram que os circRNAs possuem um papel na regulação gênica pós-transcricional por atuarem como esponjas de microRNAs.

Esse papel regulatório dos circRNAs os colocou em lugar de destaque na pesquisa científica e inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos, principalmente em mamíferos, a fim de explorar suas funções nos níveis transcricional e pós-transcricional.

A capacidade de modulação exercida pelos circRNAs sobre a ação dos microRNAs tem sido investigada no contexto de muitas doenças. Por exemplo, em relação a patologias cardíacas, a via circCDR1as (ou CiRS-7, de *circular RNA sponge for miR-7*):miR-7a está relacionada ao risco de infarto do miocárdio, uma vez que miR-7 regula negativamente mRNAs de proteínas pró-apoptóticas acionadas durante hipoxia, e sua interação com CiRS-7 impede essa ação (GENG et al., 2016).

Muitos circRNAs estão relacionados a diversos tipos de câncer, e dependendo da função das proteínas reguladas pelos microRNAs modulados por esses circRNAs, estes podem favorecer ou desfavorecer o desenvolvimento da doença, atuando como oncogenes ou supressores de tumor, respectivamente. Um exemplo de circRNA que tem função de supressor de tumor é o circRNA\_LARP4, derivado do gene LATS1 (de *Large Tumor Suppressor Kinase 1*), que age como supressor de tumor em câncer gástrico, através da atividade de esponja sobre o microRNA 424, que favorece a tumorigênese nesse tipo de câncer (ZHANG et al., 2017c). Devido a prevalência da

participação de circRNAs em diversas doenças, sua alta estabilidade, expressão tecido-específica, relativa facilidade para quantificá-los em amostras biológicas, e por poderem ser coletados do sangue e da saliva, o seu uso como biomarcadores tem sido proposto (VEA et al., 2018; KULCHESKY et al., 2016).

Por algum tempo, devido à falta de evidências, se acreditou que circRNAs não eram traduzidos *in vivo*, portanto, sendo classificados como uma classe de RNA não codificador (ncRNA, de *noncoding RNA*) com papel regulatório. Essa terminologia tem sido empregada até hoje para se referir a essas moléculas, contudo, não está totalmente de acordo com novas evidências, que mostram a tradução ou o potencial de tradução de circRNAs (YANG et al., 2017).

Em plantas, uma das funções mais marcantes de circRNAs encontrada em animais, a ação como esponja de microRNAs, não foi demonstrada funcionalmente até o momento, apesar de previsões bioinformáticas de que muitos circRNAs identificados em vegetais contém MREs para uma ou mais moléculas, e da presença de *reads* de BSJ (do inglês, *backsplicing junction*) em bibliotecas de imunoprecipitação de AGO de *A. thaliana* (CAPELARI, 2018).

Devido a importância da regulação gênica desempenhada por microRNAs, a potencial rede de interação entre circRNAs:microRNA:mRNA vem sendo predita *in silico* em alguns trabalhos com plantas, mas, como mencionado, ainda sem a obtenção de dados funcionais (LU et al., 2015; PAN et al., 2018). O banco de dados público PlantcircBase, oferece uma ferramenta para esse tipo de análise (<http://ibi.zju.edu.cn/plantcircbase/network.php>).

Lu et al. (2015) superexpressaram um circRNA endógeno de arroz *japonica* cv. Nipponbare, que apresenta sítios de ligação para o microRNA 172, afim de testar a capacidade de esponja do circRNA. Os níveis do miR172 foram quantificados nas plantas transgênicas e não apresentaram diferença em comparação aos níveis das plantas controle, mas, surpreendentemente, os níveis do gene parental do circRNA foram fortemente reduzidos em folhas e panículas das plantas transgênicas, sugerindo um papel desse circRNA na regulação de seu gene parental.

Outra evidência da modulação de um circRNA sobre seu gene parental foi observada em *A. thaliana*, onde um circRNA formado pelo éxon 6 do gene *SEPALLATA3* após um evento de éxon *skipping* ocasionado por *splicing* alternativo deste gene, foi capaz de aumentar os níveis dessa forma variante do transcrito linear sem o éxon 6. O mecanismo envolvido se dá pela ligação do circRNA ao gene parental, formando um duplex RNA:DNA que causa uma interrupção temporária na transcrição, facilitando a ocorrência do *splicing* alternativo (CONN et al., 2017).

A responsividade de circRNAs a certos tipos de estresse foi avaliada em algumas espécies de plantas. Em *Arabidopsis*, a expressão de circRNAs foi três vezes maior em plantas submetidas à alta temperatura (38 °C) do que em plantas na condição controle (21 °C). O estresse térmico também provocou aumento no número de circRNAs exônicos e no número de éxons que compunham os

circRNAs, além de induzir *backsplicing* alternativo, aumentando o número de isoformas de circRNAs (PAN et al., 2018).

Condições limitantes de nutrientes também são capazes de alterar o padrão de expressão de circRNAs, como mostrado por YE et al. (2015), que detectaram 27 circRNAs diferencialmente expressos em plantas de arroz cultivadas sob insuficiência de fósforo, sendo 21 circRNAs sobre expressos e seis sob expressos.

## 1.5 O gênero *Oryza*

O gênero *Oryza* pertence à família Poaceae e é composto por 24 espécies e onze tipos de genomas (ATWELL et al., 2014). Entre as espécies do gênero, duas são cultivadas [*Oryza sativa* L. (arroz asiático) e *Oryza glaberrima* (arroz africano)]. Acredita-se que a espécie *O. sativa* L. tenha evoluído a partir das espécies *Oryza rufipogon* Griff. e *Oryza nivara* (Xu et al., 2012), enquanto *O. glaberrima* seja resultante de um processo de domesticação de *Oryza barthii* (Li et al., 2011). As demais espécies do gênero são selvagens, sem representatividade comercial, porém, apesar de possuírem traços agronômicos inferiores às espécies domesticadas, representam um importante “banco” de diversidade genética dentro do grupo.

As espécies de *Oryza* cultivadas são diploides ( $2n = 24$ ), e as selvagens são diploides ou tetraploides ( $2n = 24$ ;  $2n = 48$ ), abrangendo os genomas AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, KKLL, HHJJ e HHKK (ATWELL et al., 2014). O arroz asiático possui duas subespécies intensamente cultivadas, *japonica* e *indica* (genoma AA), e é uma das principais culturas mundiais, alimentando mais de 3,5 bilhões de pessoas no mundo todo, com destaque para uma parcela de mais de 500 milhões de pessoas que vivem em condições de pobreza na Ásia, para as quais o grão representa cerca de 50% da energia calórica consumida na dieta (MUTHAYYA et al., 2014).

Sua cultura conta com mais de 167 milhões de hectares (ha) de área plantada no mundo e uma produção global de mais de 760 milhões de toneladas. O continente asiático é o líder mundial na produção desse cereal, sendo responsável por 90,7% da produção, seguido pelas Américas (5,2%), África (3,5%), Europa (0,6%) e Oceania (0,1%). Entre os 10 principais países produtores de arroz, o Brasil ocupa o nono lugar, com mais de 11 milhões de toneladas colhidas (média de 1994 à 2017) em uma área de mais de 2 milhões de ha (FAO - Food and Agriculture Organization <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>).

Além da importância relativa à economia e à segurança alimentar, o arroz é a principal planta modelo do grupo das Monocotiledôneas, sendo amplamente usado desde a pesquisa básica à aplicada. Apesar da relativa estabilidade no cultivo desse cereal, a planta é sujeita a diversos estresses bióticos e abióticos, que podem prejudicar sua produtividade. Espécies de *Oryza* relacionadas têm sido estudadas

a fim de buscar características genéticas capazes de conferir resistência ou tolerância a fatores biológicos e ambientais prejudiciais ao arroz.

Por exemplo, a espécie *O. rufipogon* (genoma AA) tem sido utilizada para introgressão de genes em *O. sativa*, com o objetivo de conferir tolerância a diferentes injúrias, como baixas temperaturas, seca, salinidade, submersão, toxicidade ao alumínio e ao ferro, deficiência de fósforo, resistência a brusone, entre outras. *O. sativa* f. *spontanea* (genoma AA) apresenta resistência ao vírus do enrolamento do arroz, à ferrugem bacteriana, tolerância à seca e à submersão. *Oryza longistaminata* (genoma AA) apresenta resistência à ferrugem bacteriana, à broca amarela do colmo, e tolerância ao calor e à seca. *Oryza punctata* (genomas BB e BBCC) possui tolerância ao calor e à seca e resistência à ferrugem bacteriana. *Oryza latifolia* (genoma CCDD) possui resistência à cigarrinha marrom (*Nilaparvata lugens*) e à cigarrinha do dorso branco (*Sogatella furcifera*), à ferrugem bacteriana e tolerância à submersão. *Oryza australiensis* (genoma EE) apresenta tolerância ao calor e à seca, bem como resistência à cigarrinha marrom, à ferrugem e à brusone (revisado em SANCHEZ et al., 2014; MENGUER et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar e validar RNAs circulares em *Oryza sativa* L. subespécie *japonica* cultivar Nipponbare e avaliar sua conservação dentro do gênero.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a identificação genômica *in silico* de circRNAs em *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare;
- b) Caracterizar os RNAs circulares identificados *in silico*;
- c) Validar os RNAs circulares por PCR e sequenciamento em diferentes tecidos da planta;
- d) Avaliar a presença dos RNAs circulares confirmados em arroz ssp. *japonica* cv. Nipponbare em outras espécies do gênero *Oryza*.

### 3. JUSTIFICATIVA

O conhecimento sobre circRNAs vem aumentando progressivamente desde o início desta década. Avanços acerca de sua biogênese, funções e potenciais aplicações biotecnológicas têm ocorrido principalmente em relação a mamíferos. Em plantas, apesar dos estudos sobre o tema, o conhecimento disponível sobre circRNAs permanece mais restrito, uma vez que ainda não foi possível determinar seu mecanismo de biogênese nem evidenciar algumas das funções já reportadas em mamíferos.

No gênero *Oryza*, somente a espécie *O. sativa* foi utilizada para estudos sobre circRNAs. Nenhum estudo foi publicado sobre como se dá a expressão e a possível conservação desses transcritos em outras espécies do gênero. A relevância deste trabalho pode ser associada à importância do estudo do padrão evolutivo das sequências dos circRNAs e de seu padrão de expressão nos diferentes tecidos das diversas espécies que compõe o gênero *Oryza*. Estas informações poderão ser utilizadas em programas de melhoramento vegetal ou de edição gênica, visando a obtenção de características de interesse agrônomo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Identificação *in silico* de RNAs circulares

Dados de ssRNA-seq depositados no banco de dados de domínio público *European Nucleotide Archive* (ENA) do *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), sob o código PRJEB8082 (LU et al., 2015), foram utilizados para a identificação de circRNAs em arroz, empregando o *software* CirComPara (GAFFO et al., 2017) (<http://github.com/egaffo/CirComPara>).

Ao todo, foram utilizadas nove bibliotecas *paired-end* de ssRNA-seq com tratamento RiboMinus® (ThermoFisher) e depleção de RNAs mensageiros, as quais foram sequenciadas por Illumina HiSeq 2000 e obtidas a partir de amostras em duplicatas biológicas e técnicas de folhas maduras e panículas de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare (Tabela 1).

Tabela 1. Bibliotecas usadas na identificação *in silico* de circRNAs em arroz e seus códigos de acesso ao ENA.

Tecido	Acesso da Amostra	Acesso da Corrida
Folha	SAMEA3231500	ERR748783
	SAMEA3231501	ERR748784
	SAMEA3231502	ERR748785
	SAMEA3231503	ERR748786
	SAMEA3231504	ERR748787
Panícula	SAMEA3231505	ERR748788
	SAMEA3231506	ERR748789
	SAMEA3231507	ERR748790
	SAMEA3231508	ERR748791

A escolha do *software* CirComPara se deu em razão de sua *pipeline* empregar 4 métodos distintos de predição de circRNAs, sendo que cada método aplica um ou mais ancoradores, com critérios específicos de detecção. Esta abordagem de múltiplos métodos o difere dos demais programas disponíveis para identificação de circRNAs (os quais geralmente utilizam apenas um método de detecção), pois, tende a elevar a confiabilidade do resultado final e diminuir a chance de falsos positivos (GAFFO et al., 2017). Um *workflow* da *pipeline* do *software* CirComPara é apresentado na Figura 3.

Os arquivos individuais em formato FASTQ das bibliotecas, juntamente com o arquivo em formato multi FASTA do genoma de referência da espécie (IRGSP 1.0), obtido do Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>), e o arquivo de anotação gênica em formato GTF, também obtido do Ensembl Plants, foram utilizados como dados de entrada para as análises de bioinformática no CirComPara.

O número mínimo de 2 *reads* detectadas por cada método foi usado como critério de predição de eventos de *backsplicing*, ou seja, de circRNAs.

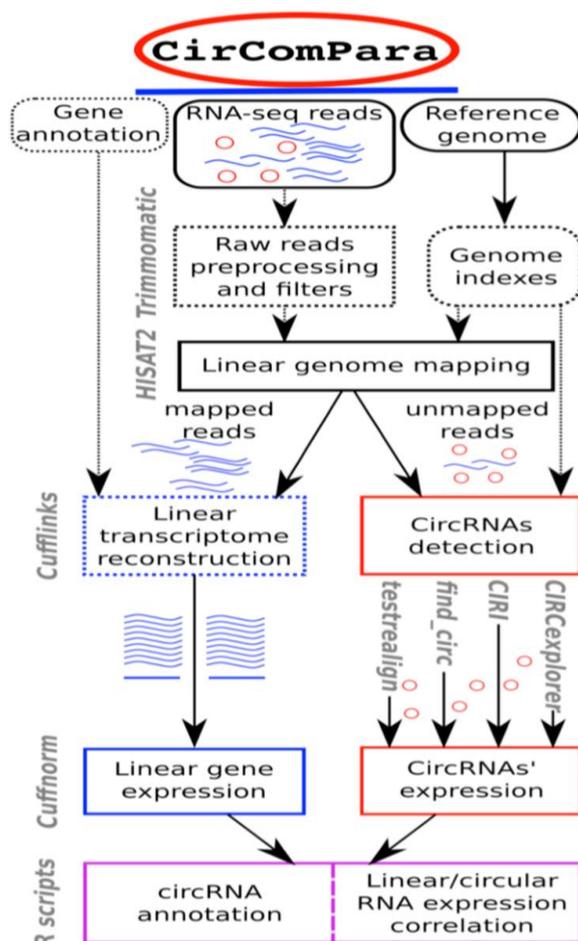


Figura 3: Workflow do software CirComPara (adaptado de GAFFO et al., 2017).

## 4.2 Validação dos RNAs circulares identificados *in silico*

Após a identificação por bioinformática, os circRNAs que satisfizeram os critérios de 1) ser detectado por, ao menos, 3 métodos; 2) estar presente em, ao menos, 3 bibliotecas; 3) possuir origem exônica (EcircRNA); e 4) possuir sítios de ligação para microRNAs, foram caracterizados e validados por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento.

### 4.2.1 Identificação de sítios de ligação de microRNAs nos circRNAs

Para verificar a presença de sítios de ligação de microRNAs nas sequências dos circRNAs, um arquivo contendo as sequências dos microRNAs maduros já identificados em arroz foi obtido do banco de dados público miRbase (*release 22*) (<http://www.mirbase.org/>).

Em seguida, esse arquivo foi utilizado como *input* no servidor Plant Small RNA Target (psRNA Target) (<https://plantgrn.noble.org/psRNATarget/home>), juntamente com a sequência exônica de cada

circRNA, para análise da complementariedade de bases entre ambos. O valor de *maximum expectation*, que reflete a quantidade de *mismatches* entre o microRNA maduro e a sequência alvo (quanto maior for esse valor, menor a similaridade entre as sequências do microRNA e seu alvo), foi ajustado para o valor máximo de 5.

#### 4.2.2 Material vegetal

Ao todo, sete espécies do gênero *Oryza* foram avaliadas neste trabalho, a saber: *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare, *Oryza sativa* f. *spontanea*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogon*, e *Oryza australiensis*.

Plantas de *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare foram cultivadas em sala de aclimação no Laboratório de Genômica Funcional de Plantas da UFRGS, em Porto Alegre/RS (latitude (S): 30°4'2.71"; longitude (O): 51°7'11.88"), sob fotoperíodo de 16 h claro/8 h escuro, à 28°C. Os tecidos utilizados para análise nessa espécie foram folhas jovens e maduras de plantas adultas, e raízes de plântulas cultivadas nas condições descritas a seguir. Plantas das demais espécies avaliadas, bem como de *O. sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare foram cultivadas em sala de aclimação no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS, sob fotoperíodo de 16 h claro/8 h escuro, à 26 ± 1 °C. As sementes foram germinadas em papel filtro embebido em água destilada e transferidas para vermiculita, onde foram cultivadas por 15 dias. Após, as plântulas foram transferidas para a solução hidropônica Hoogland e, ao término de 15 dias, seus tecidos foram coletados para análise. Nas espécies *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon*, e *O. punctata* foram avaliadas folhas e raízes. Em *O. longistaminata*, *O. australiensis*, e *O. latifolia* somente raízes foram utilizadas para análise. Após coleta, os tecidos foram armazenados em Nitrogênio líquido para posterior extração do RNA total. As amostras de RNA de raízes de arroz e de folhas e raízes das demais espécies foram obtidas durante o desenvolvimento da tese de doutorado da aluna Andriele Wairich no referido laboratório e cedidas para este estudo.

#### 4.2.3 Desenho de oligonucleotídeos divergentes para detecção de circRNAs

*Primers* divergentes apresentam sentidos opostos em uma sequência linear, de modo que quando anelados em DNA genômico ou em cDNA produzido a partir de transcritos lineares, como mRNAs, por exemplo, um par de *primers* divergentes não deve produzir um *amplicon*. Entretanto, se a sequência linear for circularizada, estes *primers* passarão a ter um sentido convergente e, somente neste caso, deverá haver formação de um produto de PCR (Figura 4). Desta forma, foram desenhados oligonucleotídeos divergentes, que permitem a amplificação de uma região que contém a junção do *backsplicing*, para detecção dos circRNAs por PCR, bem como por sequenciamento.

A sequência do transcrito do gene parental de cada circRNA foi obtida do Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e, em seguida, a sequência do circRNA, sem os íntrons, foi sobreposta a ela para a identificação da sequência do mRNA correspondente ao circRNA. Após, a sequência do primeiro éxon do circRNA, a qual contém a extremidade 5', foi utilizada para a geração do *primer universal reverse* (PuR), e a sequência do último éxon do circRNA, a qual contém a extremidade 3', foi utilizada para a geração do *primer circular forward* (PcF) no *software* Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tabela 2).

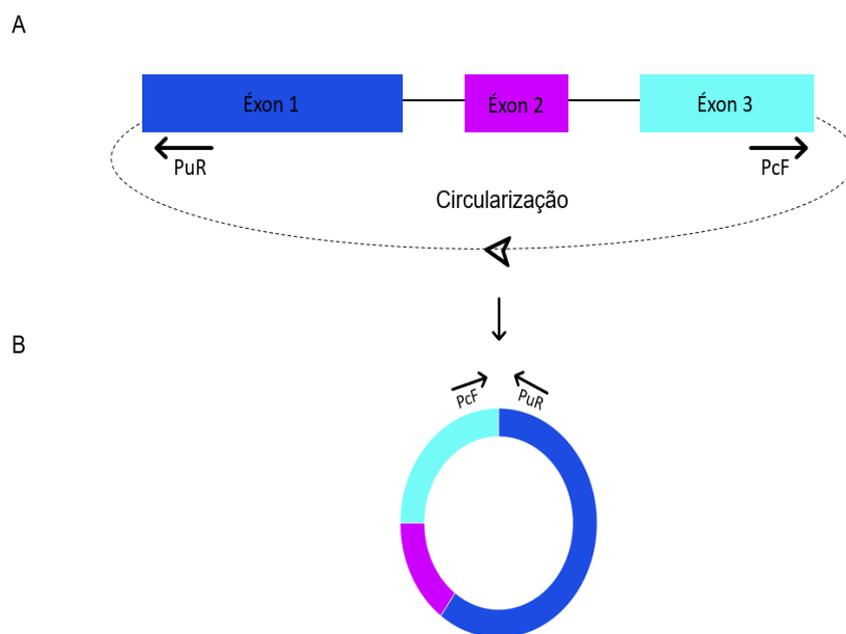


Figura 4: **A** Representação de uma sequência gênica linear com *primers* divergentes (PuR e PcF) anelados. Os sentidos opostos dos *primers* impedem a alongamento de um amplicon. Se o transcrito linear sofrer circularização, os *primers* passarão para um sentido convergente, permitindo a amplificação de um produto de PCR (**B**).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para detecção dos circRNAs e tamanho dos *amplicons* esperados.

Locus	PuR	PcF	<i>Amplicon</i> (pb)
Os02g25580	CGGACATGTCATTCAGGAAC	AACTGGGGGAGAGATATCC	126
Os03g12064	CCTCGGTTTGAAAATGCAC	CGTTCCCATGTTTGTGAAG	237
Os06g45860	CAGCAGTAACGAGGTCAC	CAACAGCAGCTCTGAAAC	151
Os07g47530	TGGCCAACCGTAAAATGAG	TTCAGCAAGGGCAATATCC	161
Os04g59000	CAAACCTCCTGTCGAATTCAG	CAAGGGGGAGAAATGACTG	147
Os05g05480	CCTGTGCTTGCATGTTG	GTAAAGAGAAGGGGAGATGAC	110
Os05g29030	GACTCCCTCACCGCC	CTCACCGTCGACTTCAAG	123
Os01g50622	TGCATCATGGACCATTCTG	GCAATGAAGAGGAGACTATTAGC	110
Os03g52840	CATAGTCATAAAGACGC	ACAGCAAAGGCTACGAAC	151
Os06g28194	TCTTCCTGGCCACGTAC	AATGGTTGGGTTCTCGATG	228
Os09g17329	GCAGTGTCCCTTCAGTGGT	CATCAACAGGTCGACATTGC	164
Os11g16540	AGAAACATATGCAGCGAGCA	AGGGGAGAAAAGGAAAGCAA	176

#### 4.2.4 Extração do RNA total

Os tecidos coletados foram macerados em Nitrogênio líquido e a extração do RNA foi realizada com TRIzol® (Invitrogen), seguindo-se o protocolo fornecido pela fabricante: cerca de 100 mg do material pulverizado foi homogeneizado com 1 mL de TRIzol® e incubado por 5 min à temperatura ambiente, em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e a solução foi agitada por inversão durante 15 s, seguida de uma segunda incubação à temperatura ambiente, por 3 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, à 4 °C, por 15 min e a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Um volume de álcool isopropílico à 4 °C, equivalente ao da fase aquosa (0,5 mL), foi adicionado à solução, a qual foi novamente incubada por 10 min, à temperatura ambiente. Um segundo ciclo de centrifugação foi realizado a 12.000 rpm, à 4°C, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o RNA precipitado foi lavado com etanol 75 %, à 4 °C, durante 5 min. Após remoção do etanol, as amostras foram incubadas por 3 min em banho-maria à 50 °C. Então, o *pellet* foi secado em temperatura ambiente e, após, 30 µL de água ultrapura estéril foram adicionados para solubilização da amostra. A centrífuga utilizada foi o modelo 5414 D, com rotor EL 02 F-45-24-11 (Eppendorf).

#### 4.2.5 Síntese do DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega), num volume final de 30 µL. Uma solução com volume de 200 µL, contendo os *primers* universais reversos (PuR) de cada um dos doze circRNAs foi preparada, onde 10 µL de cada PuR (10 µM) foi diluído em 80 µL de água ultrapura estéril. Após, 1 µL dessa solução foi diluída 10 X com água ultrapura estéril para cada amostra a ser testada. Em seguida, 10 µL da solução de *primers* foi adicionado à 10 µL da solução contendo o RNA na concentração de 1 µg/µL, seguido de incubação à 70 °C por 5 min em termociclador. Ao término da incubação, as amostras foram mantidas no gelo por cerca de 5 min. Posteriormente, foram acrescidos 3 µL de dNTPs (5mM), 1 µL de M-MLV RT (Promega), e 6 µL de tampão 5 X da enzima para cada amostra, atingindo o volume de 30 µL. As amostras foram incubadas em termociclador por 60 min, à 42 °C.

O cDNA sintetizado foi diluído 10 vezes com água ultrapura estéril para obtenção da solução estoque. A solução de uso para os ensaios da PCR foi obtida diluindo-se 10 vezes a solução estoque com água ultrapura estéril.

#### 4.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, de *Polymerase Chain Reaction*)

Os ensaios para confirmação dos circRNAs foram realizados por PCR convencional, em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo: 10  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído (1:100); 0,2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (5 mM); 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 2  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10 X; 0,2  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (PuR e PcF) à 10  $\mu\text{M}$ ; 0,05  $\mu\text{L}$  de Platinum Taq DNA Polymerase (0,25 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen); e 6, 15  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril. As reações foram realizadas sob as seguintes condições: um estágio inicial à 95 °C, por 1 min; 40 ciclos de desnaturação à 95 °C por 15 s, anelamento à 60 °C por 15 s, extensão à 72 °C por 15 s; e um terceiro estágio à 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5 %) e visualizados em transiluminador.

#### 4.2.7 Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados em cada PCR foram purificados com o Kit de Purificação de Produtos de PCR em Coluna (Ludwig Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido: para cada volume de amostra de PCR, foram adicionados 5 volumes de Tampão de Eluição (EB), seguido de utilização de vórtex. A mistura foi, então, transferida para coluna acoplada a um tubo de microcentrífuga com volume de 2 mL, seguido de centrifugação a 14.000 rpm, por 30 a 60 s. O filtrado foi descartado, e 600  $\mu\text{L}$  do tampão WB foram adicionados à coluna acoplada ao mesmo tubo de microcentrífuga, e uma centrifugação adicional a 12.000 rpm por 30 s foi realizada. O filtrado foi, novamente, descartado e o passo anterior foi repetido com o mesmo volume de tampão WB (600  $\mu\text{L}$ ). Após, a coluna vazia foi colocada sobre o mesmo tubo de coleta usado nos passos anteriores e centrifugada a 14.000 rpm por 2 min. A coluna foi acoplada a um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e 30  $\mu\text{L}$  do Tampão de Eluição (EB) foram adicionados. Por fim, uma incubação à temperatura ambiente por 2 a 3 min foi realizada, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 1 min. A centrífuga utilizada foi o modelo 5414 D, com rotor EL 02 F-45-24-11 (Eppendorf).

#### 4.2.8 Sequenciamento de Sanger

Os produtos de PCR dos circRNAs que apresentaram amplificação nas amostras de folhas jovens de arroz foram sequenciados com seus *primers* específicos (PuR e PcF) pelo método de Sanger. Foram realizados dois sequenciamentos para cada circRNA: um sequenciamento individual com PuR, e um sequenciamento individual com PcF. As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene, em um volume final de 6  $\mu\text{L}$ , contendo 3,3  $\mu\text{L}$  de amostra e 2,7  $\mu\text{L}$  de solução de *primer* (10  $\mu\text{M}$ ), onde cada *primer* atingiu a concentração final de 4,5 pmol/ $\mu\text{L}$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação *in silico* de RNAs circulares

As análises de bioinformática das bibliotecas *paired-end* com depleção de mRNAs e rRNAs de folhas e panículas de arroz, através do *software* CirComPara, resultaram na identificação de 89.032 putativos circRNAs (Tabela 3). O método TestRealign foi o que detectou o maior número de eventos de *backsplicing*, com 85.167 sequências preditas, enquanto que o método mais restritivo foi o Ciri, com 261 eventos de *backsplicing* detectados. O método CircExplorer detectou, ao todo, 1.801 possíveis circRNAs, sendo que seu alinhador TopHat foi o mais restritivo, com 123 eventos de *backsplicing* detectados. O elevado número de circRNAs preditos pelo TestRealign em relação aos demais métodos empregados pelo *software* CirComPara, pode ser devido a este método não realizar qualquer alinhamento pós-processamento, que torne mais precisa a identificação de circRNAs (GAFFO et al., 2017).

Tabela 3. RNAs circulares de *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare identificados pelo CirComPara.

		CircExplorer2				Ciri	FindCirc	TestRealign
		BWA	Segemehl	Star	Tophat			
CircExplorer2	BWA	393	355	83	72	82	175	181
	Segemehl		1159	117	103	123	301	524
	Star			126	87	89	99	56
	Tophat				123	100	93	49
Ciri					261	184	108	
FindCirc						1803	308	
TestRealign							85167	

### 5.2 Caracterização dos RNAs circulares

Após a primeira etapa de identificação *in silico*, foram selecionados para caracterização e validação os circRNAs que passaram pelos critérios de seleção estabelecidos: 1) ser detectado por, ao menos, 3 métodos; 2) estar presente em, ao menos, 3 bibliotecas; 3) possuir origem exônica; e 4) possuir sítios de ligação para microRNAs.

Aplicando-se tais critérios, doze circRNAs foram obtidos, tendo sido detectados por 3 a 7 métodos, e em 3 a 9 bibliotecas (Tabela 4).

Tabela 4. circRNAs identificados pelo CirComPara por, ao menos, 3 métodos e em, ao menos, 3 bibliotecas.

circRNA	Métodos	Bibliotecas
Os01g50622	4 ou 5	3
Os03g52840	4 a 7	3
Oso6g45860	4 a 6	3
Os07g47530	6 ou 7	3
Os11g16540	5	3
Os04g59000	4 a 6	4
Os03g12064	5 a 7	5
Os06g28194	7	5
Os09g17329	4 a 6	5
Os05g05480	4 a 7	7
Os02g25580	3 ou 4	9
Os05g29030	4 a 6	9

O número de microRNAs com sítios de ligação nos circRNAs variou entre os 12 transcritos circulares (Tabela 5). Os circRNAs provenientes dos loci Os03g12064 e Os05g05480 apresentaram um sítio de ligação para apenas um microRNA e a inibição, supostamente exercida por esse microRNA sobre a sequência circular, é por clivagem. Já os demais circRNAs apresentaram sítios de ligação para 2 a 12 microRNAs, com inibição putativa por clivagem ou bloqueio da tradução.

Tabela 5. MicroRNAs com sítios de ligação nos circRNAs.

Locus	<i>Expectation</i>	microRNA	Mecanismo de Inibição	Sequência (5' - 3')	Multiplicidade
Os02g25580	3	435	clivagem	uuauccggauuuggaguuga	1
	3.5	5505	clivagem	gaggauucggauugaucgcu	1
	4	5827	clivagem	uuuguugcaauuuggacuacc	1
	4.5	397a	clivagem	ucauugagugcagcguugaug	1
	4.5	5079a	clivagem	uuuggaucuguuuuuuugguau	2
	4.5	5079b	clivagem	uuuggaucuguuuuuuugguau	2
	4.5	812o-3p	tradução	gaacggucaaauguagacacgga	1
	5	1862e	clivagem	cuagauuuuuuuuuuuugggacgg	1
	5	397b	clivagem	uuuuugagugcagcguugaug	1
	5	5079a	clivagem	uuuggaucuguuuuuuugguau	2
	5	5079b	clivagem	uuuggaucuguuuuuuugguau	2
	5	5149	tradução	gaggagcugugacgauuuggga	1
	5	5500	clivagem	aucacugaugaaaucuugcggc	1
5	5817	clivagem	aucgaaauugaaagaaaagguau	1	
Os03g12064	5	5837.2	clivagem	ggugauguggagcguucggca	1
Os06g45860	4.5	2930	clivagem	uucucuucucucgcgugggcc	1
	4.5	444b.1	clivagem	uguugucuaagcuugcugcc	1
	4.5	444c.1	clivagem	uguugucuaagcuugcugcc	1
	5	169i-3p	clivagem	ugagucgcucuuaucacucaug	1
	5	6253	tradução	gaggaaauggggcaguuggguu	1
Os07g47530	4	2055	clivagem	uuuccuugggaagguuuuuc	1
	4.5	1438	clivagem	aggguaauuuuaucauuuuuaa	1
	4.5	1857-5p	clivagem	ugguuuuuuuggagcaugagg	1
	4.5	2922	clivagem	aauaagugauuaccgaaauu	1

Continuação da Tabela 5.

	3.5	5081	clivagem	uaauuuuguagcaaaauugauagu	1
	4	5524	tradução	uggaaaauguguucaugacgg	1
	4.5	1428a-5p	clivagem	cguuuugcaaaauucgacggcc	1
	5	1320-5p	clivagem	uggaacggaggaaauuuauag	1
	5	1870-3p	clivagem	uuuagggcuaauucagcaugaaca	1
Os04g59000	5	2055	clivagem	uuuccuugggaaggguuuuc	1
	5	2105	clivagem	uugugaugugaauugauucau	1
	5	417	clivagem	gaauguagugaauuuguucca	1
	5	5794	tradução	ugaggaaucacuaguagucgu	1
	5	6245b-3p	clivagem	guauaggugucgguucauuua	1
	5	6255	clivagem	ugggaaaaaugggcaguugaagu	1
Os05g05480	4.5	528-3p	clivagem	ccugugcuugccucuuccauu	1
	3.5	2926	clivagem	aggucgucgacguuggugcu	1
Os05g29030	5	2103	tradução	uuuccucuccgucgcgucug	1
	5	2927	clivagem	ugucgucgucgauaggcccaug	1
	5	1428a-3p	tradução	uaagauaaagccgugaauuug	1
Os01g50622	5	5488	clivagem	ugaaggcgacugaauuuca	1
	3.5	2863b	clivagem	uucguuuuuuggacuagagu	1
Os09g17329	4.5	397a	clivagem	ucauugagucgagcguugaug	1
	5	395w	clivagem	gugaaguguuuuggggauucuc	1
	5	397b	clivagem	uuauugagucgagcguugaug	1
	5	11336-5p	clivagem	gacuuucuagcguugcccacauuc	1
	5	1850.3	clivagem	cuguuuaguucacaucauucuu	1
	5	2275d	clivagem	cuuguuuuucccaauaucuca	1
Os11g16540	5	419	clivagem	ugaugaauagcugacgauguug	1
	5	5509	tradução	uaggcauuucucuuggcaug	1
	5	5523	clivagem	ugaggaggaacauuuacuag	1
	5	816	tradução	gugacauuuuuacuacaac	1
	3.5	414	clivagem	ucauccucaucaucaucgucc	2
	4	414	clivagem	ucauccucaucaucaucgucc	2
	4.5	1846a-3p	clivagem	ugaccccguucuccucgccgg	1
	4.5	1846b-3p	clivagem	ugaccccguucuccucgccgg	1
	4.5	319a-3p	tradução	acuggaugacgcgggacuaa	1
Os06g28194	4.5	6249a	clivagem	cguagaagagcucgccggcggc	1
	4.5	6249b	clivagem	cguagaagagcucgccggcggc	1
	5	166k-5p	clivagem	gguuuguugucuggcucgagg	1
	5	2275a	tradução	uuugguuucccaauaucuca	1
	5	2275b	tradução	uuugguuucccaauaucuca	1
	5	2927	clivagem	ugucgucgucgauaggcccaug	1
	5	5082	clivagem	ugcgaugaugggcgcgcggguuca	1
	2	530-5p	clivagem	ugcauuugcaccugcaccua	1
	5	1440b	clivagem	uuuaggagagugguauuugag	1
Os03g52840	5	159a.1	clivagem	uuuggauugaaggagcucug	1
	5	159b	clivagem	uuuggauugaaggagcucug	1
	5	2091-3p	clivagem	cauacauugccuccuaggcuug	1
	5	2873b	clivagem	uuggacuugagauuugguauug	1
	5	810a	tradução	ucauaagcccaccacaugugg	1

A localização dos 12 circRNAs no genoma do arroz foi variada. Seus loci estavam presentes em 9 dentre os 12 cromossomos de *Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare. A análise da ontologia de seus genes parentais indica que estão envolvidos em diversos processos biológicos na planta, codificando proteínas cinases, fosfatases, proteases, entre outras. Apenas o gene parental do circRNA\_Os03g12064 codifica para uma proteína com função ainda desconhecida (Tabela 6).

O tamanho das sequências de cada circRNA foi bastante variável, com o menor deles apresentando 141 nucleotídeos (circRNA\_Os01g50622) e o maior 1.100 nucleotídeos (circRNA\_Os06g28194), considerando somente suas sequências sem os íntrons.

O número de éxons presentes em cada circRNA também foi variável: de 1 éxon para os circRNA\_Os05g29030 e circRNA\_Os09g17329 a 9 éxons para o circRNA\_Os02g25580 (Tabela 6).

Tabela 6. Dados de caracterização de circRNAs de arroz.

Locus	Função Proteica	Cromossomo:Posição:Fita	Nº Éxons	Tamanho com íntrons (nt)	Tamanho sem íntrons (nt)	Validação PCR*	Validação Backsplicing**
Os02g25580	Sec1 protein	2:14950803-14956208:-	9	5.406	856	+	+
Os03g12064	Unknown	3:6328345-6329178:+	3	834	417	+	+
Os06g45860	Mo-cofactor sulfurase	6:27750224-27750800:+	2	577	220	+	+
Os07g47530	AAA ATPase	7:28426090-28426740:+	3	651	427	+	+
Os04g59000	SerThr-Kinase	4:35093089-35095669:-	5	2.581	591	+	+
Os05g05480	Ser-protease	5:2726980-2728049:+	3	1.070	183	+	+
Os05g29030	Protein phosphatase 2C	5:17019124-17019556:-	1	-	433	+	+
Os01g50622	DSP1	1:29074589-29075005:-	2	467	141	+	-
Os03g52840	Ser-OH-methyltransferase	3:30301728-30302773:+	5	1.046	540	+	-
Os06g28194	Phosphoglucomutase	6:16017942-16023493:+	4	5.552	1.100	-	-
Os09g17329	PSMD10	9:10618503-10619042:-	1	-	540	-	-
Os11g16540	TPR protein	11:9166935-9170120:-	5	3.186	509	-	-

\* Apresentou amplificação de produto de PCR com o tamanho esperado.

\*\* A junção do *backsplicing* foi confirmada por sequenciamento de Sanger.

### 5.3 Validação dos RNAs circulares por PCR e sequenciamento em arroz ssp. *japonica* cv. Nipponbare

Entre os doze circRNAs selecionados para validação, nove apresentaram amplificação de produtos de PCR com os *primers* divergentes nas amostras de folhas jovens e maduras de arroz (Tabela 6). Desses, quatro circRNAs apresentaram uma única banda majoritária correspondente ao produto de amplificação esperado, tanto em folha jovem, como madura: circRNA\_Os03g12064 (237 pb), circRNA\_Os02g25580 (126 pb), circRNA\_Os06g45860 (151 pb), e circRNA\_Os07g47530 (161 pb) (Figura 5).

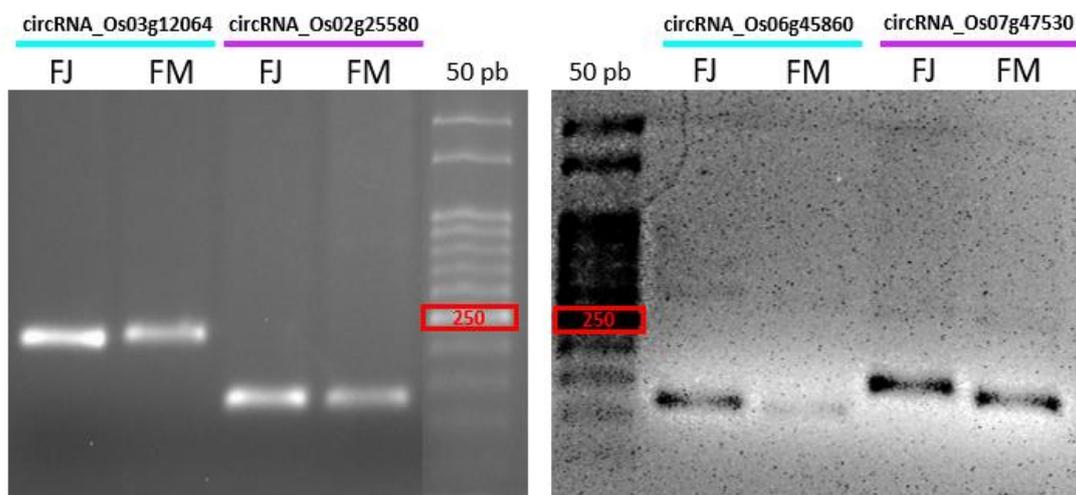


Figura 5: Expressão de circRNAs com uma única banda majoritária, correspondente à amplificação da região que contém a junção do *backsplicing*. FJ: folha jovem, FM: folha madura.

Os cinco demais circRNAs exibiram múltiplos *amplicons*, correspondentes ao esperado e a outros: circRNA\_Os05g05480 (110 pb), circRNA\_Os05g29030 (123 pb), circRNA\_Os01g50622 (110 pb), circRNA\_Os03g52840 (151 pb), e circRNA\_Os04g59000 (147 pb). A expressão se deu em ambos os estágios foliares, porém, muitas bandas que não eram esperadas exibiram um padrão de expressão diferente em cada estágio foliar (Figura 6).

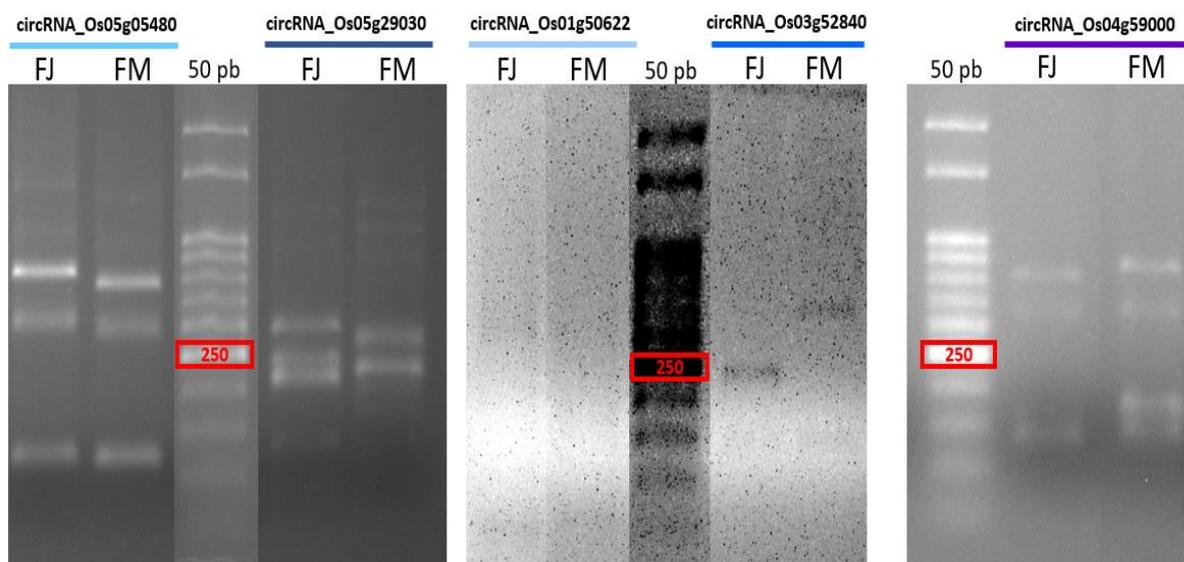


Figura 6: Expressão de circRNAs com múltiplos amplicons. FJ: folha jovem, FM: folha madura.

Nas amostras de raiz, somente os circRNA\_Os03g12064, circRNA\_Os06g45860, e circRNA\_Os07g47530 foram confirmados por PCR, exibindo um padrão de bandas nos tamanhos esperados. Não foi observada circularização alternativa para esses transcritos (Figura 7). Os demais circRNAs não apresentaram amplificação.

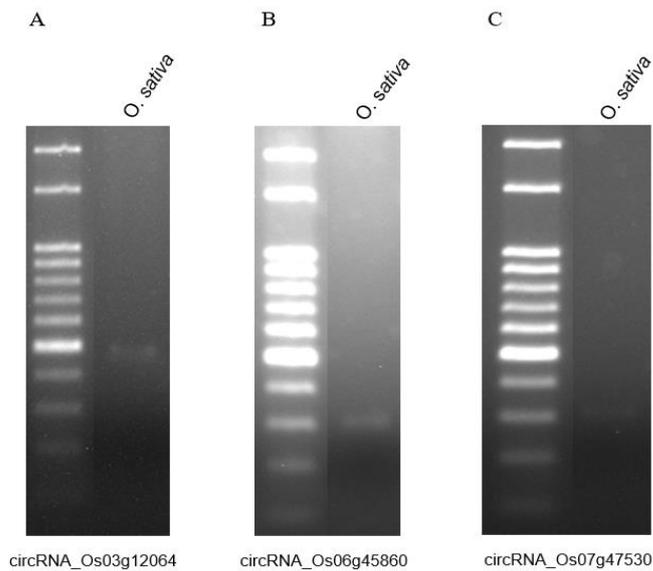


Figura 7. circRNAs que apresentaram amplificação em raízes de *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare.

Para confirmar a sua natureza, os produtos de PCR de cada um dos 9 circRNAs que apresentaram amplificação por PCR nas amostras de folhas jovens foram sequenciados com seus oligonucleotídeos iniciadores específicos (PuR e PcF). Desses, 7 circRNAs foram confirmados pelo sequenciamento de Sanger, através da presença da junção formada pelo *backsplicing* e predita por bioinformática, a qual corresponde à ligação entre um sítio 3' doador de *splicing* com um sítio 5' receptor de *splicing* (Tabela 6, Figuras 8 C e 9).

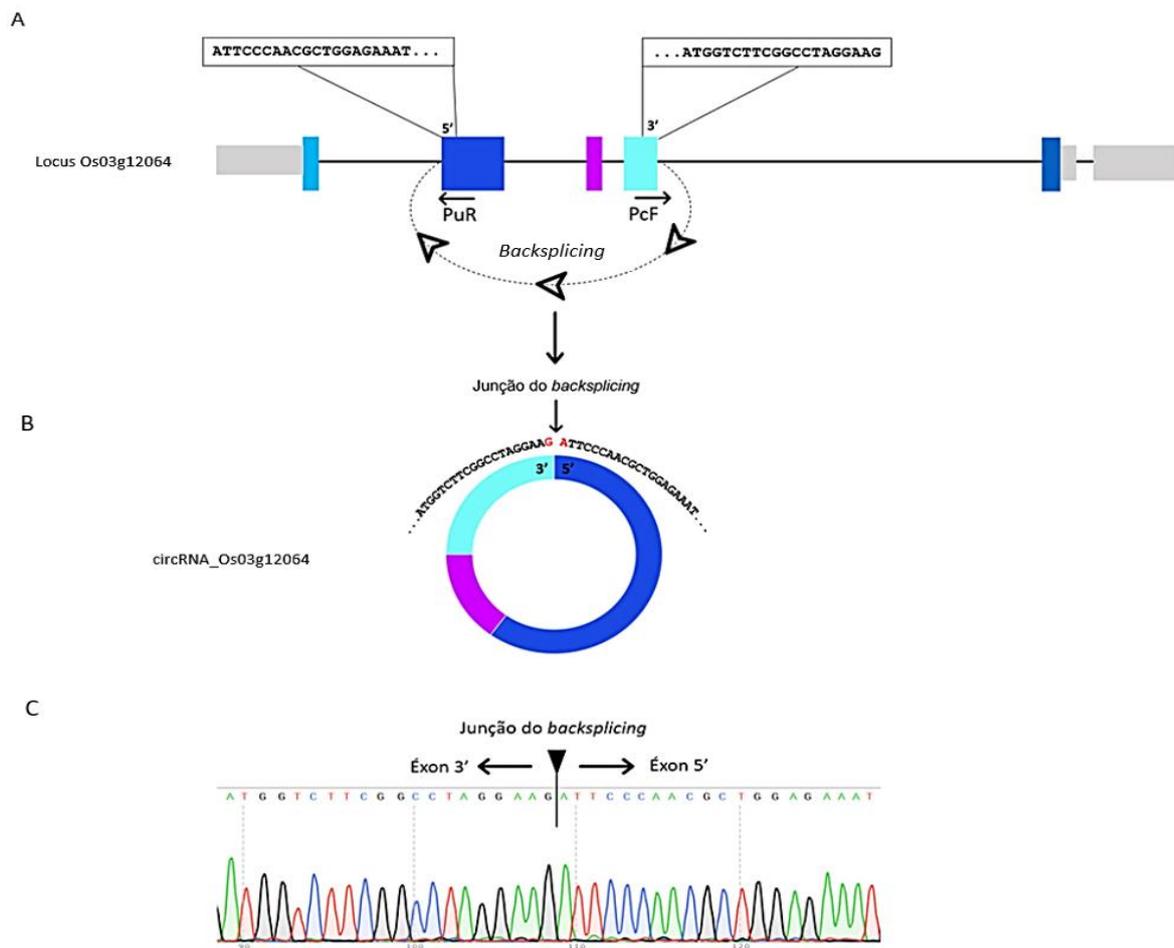
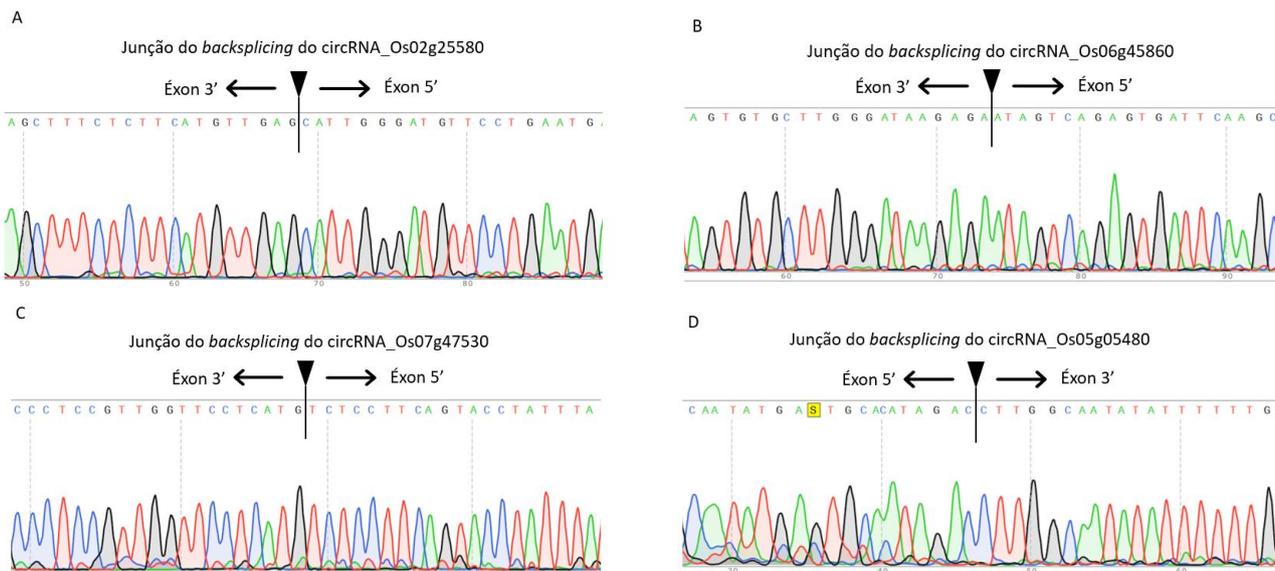


Figura 8: **A** Representação do locus Os03g12064 e do evento de *backsplicing*. Barras cinzas representam as UTRs, barras coloridas representam os éxons, e linhas sólidas representam os íntrons. As letras nas caixas retangulares representam as sequências de nucleotídeos dos éxons. PuR e PcF indicam os *primers* divergentes com sentidos opostos. A linha pontilhada com seta denota o processo de *backsplicing* e sua direção, dando origem ao circRNA (**B**). **C** Resultado do sequenciamento de Sanger para o circRNA\_Os03g12064. O triângulo invertido indica a junção do *backsplicing*.



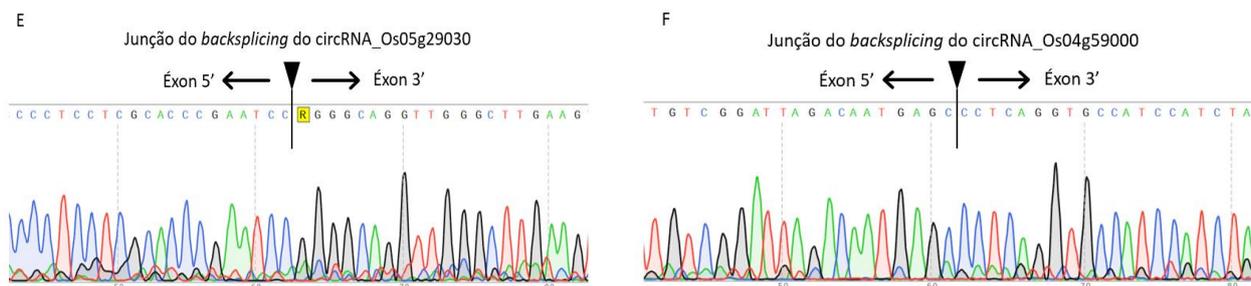


Figura 9: Perfis dos eletroferogramas obtidos por sequenciamento de Sanger com PcF (A-C) e com PuR (D-F) dos circRNAs confirmados por amplificação de PCR. Os triângulos invertidos indicam os limites entre os éxons e as junções do *backsplicing*.

#### 5.4 Análise da conservação de RNAs circulares no gênero *Oryza*

A possível conservação dos circRNAs confirmados por PCR e sequenciamento em arroz *ssp. japonica* cv. Nipponbare em outras espécies dentro do gênero foi investigada, através de PCR, em amostras de folhas e raízes em *O. sativa* f. *spontanea*, *O. punctata*, e *O. rufipogon*, e em amostras de raízes em *O. latifolia*, *O. longistaminata* e *O. australiensis*.

Nas amostras de folhas, os circRNAs que apresentaram amplificação foram os circRNA\_Os05g05480, circRNA\_Os02g25580, circRNA\_Os03g12064, e o circRNA\_Os06g45860. O circRNA\_Os05g05480 apresentou amplificação de dois produtos de PCR na espécie *O. punctata*, sendo um deles com o tamanho esperado de 110 pb, e outro em torno de 275 pb (Figura 10 A). O circRNA\_Os03g12064 apresentou bandas dentro do padrão esperado (237 pb) em *O. sativa* f. *spontanea* e em *O. punctata*. Em ambas as espécies, uma banda extra em torno de 300 pb também foi observada. Já na espécie *O. rufipogon*, houve amplificação de um fragmento com tamanho em torno de 250 pb (Figura 10 C). O circRNA\_Os06g45860 apresentou amplicons com o tamanho esperado de 151 pb em *O. sativa* f. *spontanea*, *O. rufipogon*, e em *O. punctata*, sendo que nesta última espécie uma banda adicional com tamanho em torno de 400 pb foi visualizada (Figura 10 D). O circRNA\_Os02g25580, cujo tamanho do produto de PCR esperado é de 126 pb, exibiu uma banda em torno de 150 pb em *O. rufipogon*, e uma banda acima de 250 pb em *O. sativa* f. *spontanea* (Figura 10 B).

Nas amostras de raízes, somente o circRNA\_Os03g12064 e o circRNA\_Os06g45860 apresentaram amplificação. O circRNA\_Os03g12064 exibiu um único amplicon com o tamanho esperado (237 pb) em *O. rufipogon* e em *O. sativa* f. *spontanea* (Figura 11 A), e o circRNA\_Os06g45860 exibiu amplificação de fragmentos com o tamanho esperado (151 pb) em *O. punctata*, *O. rufipogon*, *O. sativa* f. *spontanea*, e em *O. australiensis* (Figura 11 B). Em ambos os circRNA\_Os03g12064 e circRNA\_Os06g45860 não foi observada circularização alternativa nas

amostras de raízes. Nas espécies *O. latifolia* e *O. longistaminata* não houve expressão de nenhum dos circRNAs nas amostras de raízes testadas.

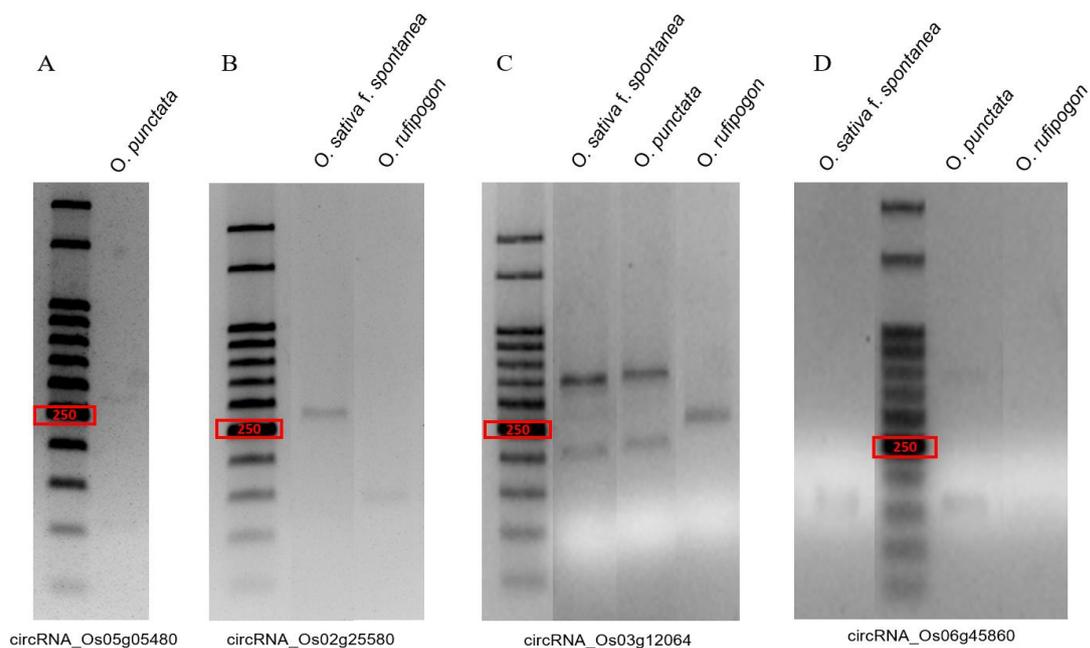


Figura 10: Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação por PCR dos circRNAs produzidos a partir de amostras de cDNA de folhas.

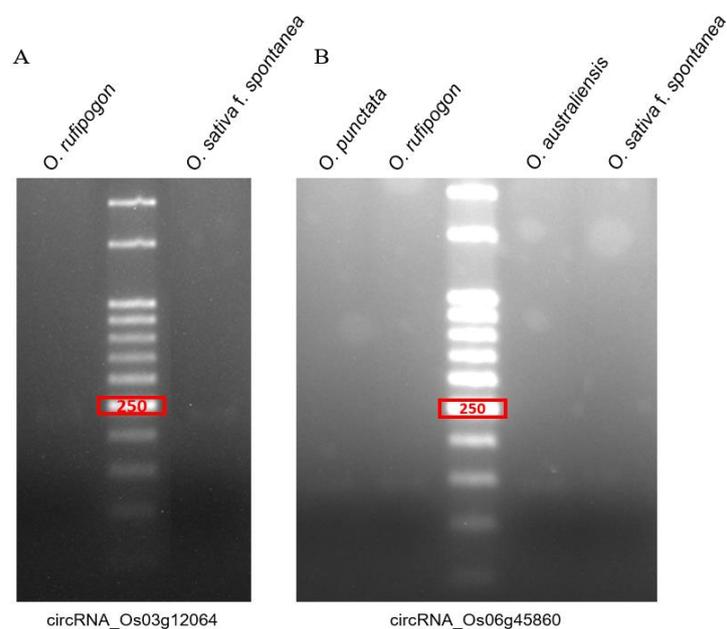


Figura 11: Gel de agarose apresentando os produtos de amplificação por PCR dos circRNAs produzidos a partir de amostras de cDNA de raiz.

## 6. DISCUSSÃO

A identificação de circRNAs pelo software CirComPara resultou em um número maior de circRNAs detectados, em comparação com os métodos empregados no estudo em que as bibliotecas aqui utilizadas foram geradas. Lu et. al (2015) identificaram 2.354 circRNAs em arroz, enquanto que o CirComPara foi capaz de predizer mais de 89 mil sequências, com a aplicação conjunta de quatro métodos (sete ancoradores ao todo). A expressiva maioria dessas sequências foi identificada pelo método TestRealign (85.167). Entretanto, quando analisamos o número de sequências identificadas por esse método juntamente com qualquer um dos outros ancoradores, há uma drástica diminuição. Por exemplo, o maior número de circRNAs detectados por dois métodos combinados foi 524 (TestRealign e Segemehl), enquanto que o menor número foi 49 (TestRealign e TopHat).

É esperado que quanto mais métodos forem combinados, a chance de falsos positivos seja reduzida (GAFFO et al., 2017), contudo os três circRNAs não confirmados por PCR com *primers* divergentes foram preditos por 4 a 7 métodos em 3 a 5 bibliotecas (Tabela 4).

Em relação aos genes parentais dos circRNAs selecionados para caracterização e validação, a análise ontológica mostrou que codificam proteínas envolvidas em importantes processos biológicos. Por exemplo, o circRNA\_Os06g45860 é formado pelos terceiro e quarto éxons (220 nt) do gene que codifica uma *Molibdenium Cofactor Sulfurase* (MoCo Sulfurase), enzima que participa do passo final de biossíntese de ABA (do inglês, *Abscisic Acid*), como cofator da enzima Aldeído Oxidase na conversão de aldeído abscísico à ácido abscísico (LU et al., 2013).

Entre todos os circRNAs avaliados, o derivado do gene Os06g45860 é o que foi detectado no maior número de espécies, exibindo amplificação por PCR em folhas jovens, maduras e raiz de arroz (Figuras 5 e 7 B), e foi positivamente validado por ressequenciamento nesta espécie. Além de *O. sativa*, esse circRNA exibiu produtos de PCR do tamanho esperado em amostras de folhas e raízes de *O. sativa* f. *spontanea*, *O. punctata* e *O. rufipogon*, e em amostras de raízes de *O. australiensis* (Figuras 10 D e 11 B).

Nas espécies *O. sativa* f. *spontanea*, *O. punctata* e *O. rufipogon*, cujos genomas sequenciados estão disponíveis, foi possível constatar que o circRNA\_Os06g45860 é também derivado de genes codificantes da proteína MoCo Sulfurase, portanto, são homólogos.

A superexpressão do gene *LOS5*, que codifica MoCo Sulfurase em *A. thaliana*, foi capaz de conferir resistência à seca em milho, através da indução do aumento dos níveis de ABA, um reconhecido hormônio vegetal, envolvido nas respostas à estresses abióticos. Os autores também observaram que as plantas transgênicas expostas à seca exibiram aumento na biomassa de raiz, diminuição na abertura estomatal, baixo dano nas membranas celulares, e aumento na expressão de

genes relacionados a estresses abióticos, sendo todos esses aspectos desejáveis para plantas tolerantes à seca (LU et al., 2013).

A obtenção dos referidos resultados para o circRNA\_Os06g45860 levam a indagação de se esse transcrito participa de algum modo da biossíntese de ABA ou se está envolvido em outros processos biológicos nas plantas.

A presença de MREs nos transcritos circulares tem sido avaliada na grande maioria dos estudos com essas moléculas, desde que foi evidenciado, em animais, que podem interagir com microRNAs e deter a ação destes sobre seus alvos (MEMCZAK et al., 2013). Em plantas a interação funcional entre essas duas classes de RNAs carece de evidências, mas, mesmo assim, a maioria dos trabalhos publicados avalia por ferramentas de bioinformática a potencial interação entre ambos (PAN et al., 2018; LU et al., 2015), já que existe uma expectativa de demonstrar que circRNAs podem agir como competidores endógenos, e de explorá-los como reguladores negativos de microRNAs, assim como em animais.

Aqui, nós encontramos que mais de 50 % dos circRNAs caracterizados possuem sítios de ligação para dois ou mais diferentes microRNAs. Um exemplo é a família de microRNA 444, cujas formas 444b.1 e 444 c.1 apresentaram sítios de ligação no circRNA\_Os06g45860. A família de microRNAs 444 parece ser conservada entre espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Plantas de trigo transgênicas superexpressando o miR444a endógeno se mostraram tolerantes a privação de Nitrogênio (GAO et al., 2016). Em arroz, genes *MADS box* são alvos de formas variantes dessa família de microRNAs (WU et al., 2009).

Eventos de circularização alternativa foram observados em amostras de folhas jovens e maduras de arroz para alguns circRNAs (Figura 6), mas não em amostras de raiz. A circularização alternativa de transcritos em arroz não é incomum e foi notadamente reportada por Lu et al. (2015) e Ye et al. (2017). No estudo de Lu et al. (2015), partindo-se de um total de 1.356 EcircRNAs avaliados *in silico*, 486 eventos de circularização alternativa foram observados, advindos de 175 genes parentais. Dos parentais, 115 exibiram apenas dois eventos de circularização alternativa, enquanto que 15 genes parentais exibiram ao menos cinco diferentes EcircRNAs. Um teste experimental mostrou que uma região intergênica, da qual um circRNA fora predito, exibiu amplificação de sete diferentes circRNAs com o uso de um par de primers divergentes. Estas isoformas também tiveram padrões de expressão específicos, com duas delas ocorrendo apenas em folhas, e as outras cinco em panícula. Em *Arabidopsis*, Pan et al. (2018) também observaram a ocorrência de *backsplicing* alternativo em plantas submetidas a estresse térmico. Em arroz, sabe-se que diversos sinais não canônicos de *splicing* estão presentes nas junções de *backsplicing*, indicando uma alta flexibilidade deste processo, e isto evidentemente pode contribuir para a formação de isoformas de circRNAs a partir de um mesmo locus (YE et al., 2017).

Em relação a conservação, Jeck et al. (2013) encontraram circRNAs derivados de genes pertencentes à família HIPK, que são expressos em níveis relativamente altos e conservados entre humanos e ratos. Rybak-Wolf et al. (2015), também encontraram circRNAs exônicos conservados entre humanos, ratos e *Drosophila*, cujos íntrons flanqueadores contém sequências reversas complementares, que facilitam a circularização. Tais evidências apontam que os circRNAs são funcionais e que há uma pressão de seleção sobre seu processo de formação.

Por fim, sobre quais são os mecanismos que precisamente governam a circularização de transcritos e como percebem e respondem de acordo com cada tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e condição específicos, ainda pouco se sabe. A respeito das funções dos circRNAs, as crescentes evidências em mamíferos, e mesmo as ainda esparsas em plantas, apontam um papel na regulação gênica transcricional e pós-transcricional, e as pesquisas envolvendo aspectos básicos dessas moléculas, como biogênese, interação com outras classes de RNA e com DNA, bem como sua manipulação a fim de modular respostas de interesse biológico são promissoras.

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível realizar a confirmação de nove circRNAs de *O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare por PCR, dos quais sete sequências tiveram suas junções de *backsplicing* também confirmadas por sequenciamento de Sanger. Eventos de circularização alternativa foram observados para alguns circRNAs, que apresentaram múltiplas isoformas, além das previstas.

A possível conservação de alguns circRNAs em diferentes espécies do gênero *Oryza* pode ser um indício de que tais transcritos são funcionais e que há uma pressão de seleção sobre seu processo de formação.

Como perspectivas, os circRNAs que apresentaram amplificação por PCR nas demais espécies de *Oryza*, deverão ser sequenciados para confirmar sua natureza. Além disso, as funções desses transcritos nas espécies em que estão presentes, bem como sua interação com microRNAs alvos deverão ser avaliadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATWELL, B. et al. Could abiotic stress tolerance in wild relatives of rice be used to improve *Oryza sativa*? *Plant Sci*, 215-216:48-58, 2014.
- BARRET, S. et al. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *eLife*, 4:e07540, 2015.
- BURD, C. et al. Expression of Linear and Novel Circular Forms of an *INK4/ARF*-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. *PLoS Genet*, 6 (12): e1001233, 2010.
- CAPEL, B. et al. Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell*, v. 73, n.5, p. 1019–1030, 1993.
- CAPELARI, E. Bibliotecas de AGO-IP de flores de *Arabidopsis thaliana* contêm RNAs circulares que podem atuar como esponjas de miRNAs. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2018.
- CHAO, C. W. et al. The mouse formin (*Fmn*) gene: abundant circular RNA transcripts and gene-targeted deletion analysis. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass.), v. 4, n. 9, p. 614–28, 1998.
- CHU, Q. et al. Characteristics of plant circular RNAs. *Briefings in Bioinformatics*, 00(00), 1–9, 2018.
- CIRCPEDIA v2. [Internet]. Disponível em <http://www.picb.ac.cn/rnomics/circpedia/>.
- COCQUERELLE, C. et al. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *The EMBO Journal*, v. 11, n. 3, p. 1095–8, 1992.
- COCQUERELLE, C. et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEBJ*. 7: 155-160, 1993.
- CONN, S. J. et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*, v. 160, n. 6, p.1125–34, 12, 2015.
- CONN, V. et al. A circRNA from *SEPALLATA3* regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nature Plants* volume 3, 17053, 2017.
- DANAN, M. et al. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic acids research*, v. 40, n. 7, p. 3131–42, 2012.
- DONG R. et al. CIRCpedia v2: An Updated Database for Comprehensive CircRNA Annotation and Expression Comparison. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018.
- DOU, Y. et al. Genome-wide Discovery of Circular RNAs in the Leaf and Seedling Tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Genomics*. 18(4):360-365, 2017.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) [Internet]. Citado em 30/01/2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- GAFFO, E. et al. CirComPara: A multi-method comparative bioinformatics pipeline to detect and study circRNAs from RNA-seq data. *Non-Coding RNA*, v. 3, n. 1, p. 8, 10, 2017.
- GENG, H. et al. The Circular RNA *Cdr1as* Promotes Myocardial Infarction by Mediating the Regulation of miR-7a on Its Target Genes Expression. *PLoS ONE* 11(3): e0151753, 2016.
- GRABOWSKI, P. et al. The Intervening Sequence of the Ribosomal RNA Precursor Is Converted to a Circular RNA in Isolated Nuclei of Tetrahymena. *Cell*, v. 23, p. 467-476, 1981.

- GAO, S. et al. Wheat microRNA Member TaMIR444a Is Nitrogen Deprivation-Responsive and Involves Plant Adaptation to the Nitrogen-Starvation Stress. *Plant Mol Biol Rep*, 34: 931, 2016.
- GUO, J. U. et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, v. 15, n. 7, p. 409, 2014.
- HOUSELEY, J. M. et al. Noncanonical RNAs from transcripts of the *Drosophila* muscleblind gene. *Journal of Heredity*, v. 97, n. 3, p. 253–260, 2006.
- JECK, W. R. et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, v. 19, n. 2, p. 141–157, 2013.
- JECK, W. R.; SHARPLESS, N. E. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nature Biotechnology*, v. 32, n. 5, p. 453–461, 2014.
- KELLY, S. et al. Exon Skipping Is Correlated with Exon Circularization. *J Mol Biol.* 31;427(15):2414-2417, 2015.
- KJEMS, J. et al. Novel Splicing Mechanism for the Ribosomal RNA Intron in the Archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Cell Press*, v. 54, p. 693-70, 1988.
- KULCHELSKI, F. et al. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker. *Journal of Plant Biotechnology*, 2016.
- LI, Z. et al. Genetic diversity and domestication history of African rice (*Oryza glaberrima*) as inferred from multiple gene sequences. *Theor Appl Genet*, 123:21–31, 2011.
- LIANG, G. et al. Genome-wide profiling of *Sus scrofa* circular RNAs across nine organs and three developmental stages. *DNA Research*, 24(5), 523–535, 2017.
- LU, T. et al. Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. *RNA*, v. 21, n. 12, p. 2076–87, 2015.
- LU, Y. et al. Overexpression of Arabidopsis molybdenum cofactor sulfuryase gene confers drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *PLoS One*. 8(1):e52126, 2013.
- MEMCZAK, S. et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 333–338, 2013.
- MENGUER, P. et al. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. *Genet Mol Biol.* 40(1 suppl 1):238-252, 2017.
- MUTHAYYA, S. et al. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann N Y Acad Sci.* 1324:7-14, 2014.
- NIGRO, J. M. et al. Scrambled exons. *Cell*, v. 64, n. 3, p. 607–613. 1991.
- PAN, T. et al. Heat stress alters genome-wide profiles of circular RNAs in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, v. 96, n. 3, p. 217–229, 2018.
- PLANTCIRCBASE 3.0. [Internet]. Disponible em: <http://ibi.zju.edu.cn/plantcircbase/index.php>.
- RYBAK-WOLF, A. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Molecular Cell*, 58, 870–885, 2015.

- SALZMAN, J. et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e30733, 2012.
- SANCHEZ, P. et al. The Wild Relative of Rice: Genomes and Genomics. In: Q. Zhang and R.A. Wing (eds.), *Genetics and Genomics of Rice, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 5*. Springer Science Business Media New York, 2014.
- SANGER, H. L. et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, n. 11, p. 3852–6, 1976.
- SHEN, L. et al. Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish. *FEBS Letters* 591 213–220, 2017.
- TONG, W. et al. Circular RNA architecture and differentiation during leaf bud to young leaf development in tea (*Camellia sinensis*). *Planta*. 248(6):1417-1429, 2018.
- VEA, A. et al. Circular RNAs in blood. In: J. Xiao (ed.), *Circular RNAs, Advances in Experimental Medicine and Biology* 1087. Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2018.
- VENØ, M. T. et al. Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. *Genome biology*, v. 16, n. 1, p. 245, 2015.
- WANG, P. L. et al. Circular RNA Is Expressed across the Eukaryotic Tree of Life. *PLoS ONE* 9(3): e90859, 2014.
- WU, S. et al. Rice MicroRNA effector complexes and targets. *Plant Cell*. 21(11): 3421-35, 2009.
- XU, X. et al. Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. *Nature Biotechnology*, 30, 105–111, 2012.
- YANG, Y. et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Research*, v. 27, n. 5, p. 626–641, 2017.
- YE, C.-Y. et al. Widespread noncoding circular RNAs in plants. *The New phytologist*, v. 208, n. 1, p. 88 – 95, 2015.
- ZAPHIROPOULOS, P. G. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 13, p. 6536–6541, 25, 1996.
- ZAPHIROPOULOS P. G. Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol*. 17(6):2985-93, 1997.
- ZHANG, X. O. et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, v. 159, n. 1, p. 134–147, 2014.
- ZHANG, Y. et al. The biogenesis of nascent circular RNAs. *Cell Reports* 15, 611–624 April 19, 2016
- ZHANG, J. et al. Circular RNA\_LARP4 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by sponging miR-424-5p and regulating LATS1 expression. *Mol Cancer*.16(1):151, 2017.

## CURRICULUM VITAE

**Débora Camargo Zamban**

### **Formação acadêmica**

2007 - 2012 Graduação em Ciências Biológicas.  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Zoneamento Ambiental do Município de Bom Jesus (RS) para Posterior Aplicação na Agricultura Orgânica

### **Formação complementar**

- 2015 - 2015 Curso de curta duração em Cadastro Ambiental Rural - CAR. (Carga horária: 16h).  
Senar - Serviço de Aprendizagem Rural (RS), SENAR, Brasil
- 2014 - 2014 Curso de curta duração em Geotecnologias para a Gestão de B. Hidrográficas.  
(Carga horária: 24h).  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil
- 2013 - 2013 III Curso de Extensão Botânica no Inverno. . (Carga horária: 120h).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013 Curso de curta duração em I Curso de Férias em Expressão Gênica. (Carga horária: 48h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2011 - 2011 Curso de curta duração em I Curso de Extensão em Biologia Marinha. (Carga horária: 20h).  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2009 - 2009 Jovem Pesquisador: Formação Científica. . (Carga horária: 12h).  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2008 Extensão universitária em Programa de Educação Continuada - Biociências. (Carga horária: 480h).  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Rodrigues, Lia Rosane; ZAMBAN, D. C.; PACHECO NETO, Calino Ferreira; Silvério, Adriano; Bergonci, João Ito; Mariath, Jorge Ernesto de Araújo  
Características de tubos polínicos de *Passiflora edulis* emitidos in vitro sob diferentes osmolaridades. In: VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2011, Joinvile. Resumos. Lavras: ABCTP, 2011. v.5.
2. ZAMBAN, D. C.; Rodrigues, Lia Rosane; PACHECO NETO, Calino Ferreira; Silvério, Adriano; Bergonci, João Ito; Mariath, Jorge Ernesto de Araújo  
Germinação in vitro de pólen de cinco espécies de *Passiflora* visando a estudos de viabilidade e herança citoplasmática In: VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 2011, Joinvile. Resumos. Lavras: ABCTP, 2011. v.5.
3. ZAMBAN, D. C.; FELIX, L. M.; BRENTANO, A. M.; SANTAREM, E. R.  
Alterações Metabólicas de *Hypericum perforatum* em Resposta ao Patógeno *Agrobacterium rhizogenes* In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre. Anais do IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS. , 2008.
4. BRENTANO, A. M.; ZAMBAN, D. C.; SANTAREM, E. R.  
Efeito de Reguladores do Crescimento no Enraizamento de Brotações de *Hypericum perforatum* in vitro In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre. Anais do IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS. , 2008.
5. FELIX, L. M.; ZAMBAN, D. C.; BRENTANO, A. M.; SANTAREM, E. R.  
Metabolism of phenylpropanoids in in vitro shoot of *Hypericum perforatum* infected with *Agrobacterium rhizogenes* In: XIII Reunión Latinoamericana de Fisiologia Vegeta, 2008, Rosario. Resúmenes. Rosario: Assoc Argent de Fisiol Veg, 2008. p.119 - 119
6. ZAMBAN, D. C.; DALMAS, F. R.; POIATTI, V. A. D.; ASTARITA, L. V.  
Respostas de Defesa em Plantas de *Solanum tuberosum* Induzidas pela Fitobactéria *Xanthomonas axonopodis* In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre. Anais do IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS. , 2008.
7. SANTAREM, E. R.; ZAMBAN, D. C.; FELIX, L. M.; ASTARITA, L. V.  
Secondary Metabolism of *Hypericum perforatum* Induced by *Agrobacterium rhizogenes* In: World Congress on In Vitro Biology, 2008, Tukson. World Congress on In Vitro Biology. , 2008.

## Apresentação de trabalhos

1. ZAMBAN, D. C.; ESCUDERO, F. L. G.; MARGIS, M. M. A. N. P.; MARGIS, R.  
IDENTIFICATION OF CIRCRNAS FROM ORYZA SATIVA L. BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS, 2017.
2. ZAMBAN, D. C.; FELIX, L. M.; BRENTANO, A. M.; SANTAREM, E. R.  
Alterações Metabólicas de *Hypericum perforatum* em resposta ao patógeno *Agrobacterium rhizogenes*, 2008.
3. ZAMBAN, D. C.; DALMAS, F. R.; POIATTI, V. A. D.; ASTARITA, L. V.  
Respostas de Defesa em Plantas de *Solanum tuberosum* induzidas pela fitobactéria *Xanthomonas axonopodis*, 2008.

## **Informação adicional**

Recebimento de menção honrosa pela participação no Prêmio Paulo Soderro Martins na área de Genômica e Bioinformática, com o trabalho intitulado "Identification of circRNAs from ORYZA SATIVA L. by High-throughput sequencing and bioinformatic analysis" autoria de Zamban, DC; Escudero, FLG; Margis-Pinheiro, M; Margis, R, apresentado durante o Genética 2017 - Brazilian International Congress of Genetics, em Águas de Lindóia, SP, de 12 a 15 de Setembro de 2017.